



DEPARTAMENTO DE FÍSICA

DESENVOLVIMENTO DE UMA COBERTURA PARA FERIDAS
BASEADA EM NANOFIBRAS DE IODOPOVIDONA

POR:

Andreia Sofia Pombinho Fernandes

DISSERTAÇÃO APRESENTADA NA
FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

Orientadora:

DOUTORA CÉLIA MARIA REIS HENRIQUES

Co-orientadores:

DOUTORA ILDA MARIA BARROS DOS SANTOS GOMES SANCHES

DOUTOR JORGE ALEXANDRE MONTEIRO CARVALHO SILVA

LISBOA
MAIO 2011

DESENVOLVIMENTO DE UMA COBERTURA PARA FERIDAS BASEADA EM NANOFIBRAS DE IODOPOVIDONA

©2011 - Todos os direitos reservados. Andreia Sofia Pombinho Fernandes.
Faculdade de Ciências e Tecnologia. Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

*Aos meus avós, Maria Etelvina e João Manuel,
que foram, e serão sempre, o melhor exemplo de força e amor.*

*Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive*
Ricardo Reis - Fernando Pessoa (1888 - 1935)

AGRADECIMENTOS

*O caminho faz-se ao andar. (...) \ E ao olhar para trás
Vê-se a senda que jamais, \ há-de voltar a pisar.*

Caminhante não há caminho, \ Somente sulcos no mar.

António Machado (1875 - 1939)

Este momento é, sem dúvida, um dos mais importantes da minha vida. No entanto, a vida faz-se num caminhar constante, onde aqueles que nos rodeiam e nos apoiam merecem um lugar muito especial. Por isso mesmo, não poderia deixar de recordar, agora, nesta data tão especial para mim, todos os que a tornaram possível.

Em primeiro lugar, quero agradecer aos meus orientadores, a professora Célia Henriques e o professor Jorge Silva, do grupo GREAT (Grupo de Engenharia de Tecidos), pela oportunidade, pela paciência, pelos conselhos e pelo tempo que disponibilizaram para me guiar durante este trabalho. O simples facto de me terem aceite como orientanda já foi, para mim, motivo de orgulho, tendo em conta o seu prestígio no mundo académico e o empenho em todas as tarefas em que se envolvem. Trabalhar com professores de tão reconhecido mérito é, obviamente, uma mais valia no crescimento pessoal e científico de qualquer estudante. Cumpre-me ainda realçar o seu incansável e indispensável apoio ao longo de todo este processo.

Quero também agradecer à professora Ilda Sanches, do grupo CREM, minha co-orientadora, pois, sem a sua preciosa colaboração, não me teria sido possível efectuar os testes microbiológicos. Agradeço o imenso tempo, espaço e material que me disponibilizou para concluir os objectivos do meu trabalho. Não posso deixar de referir também a inestimável ajuda da Tânia Costa (Departamento de Ciências da Vida-DCV) no apoio técnico, dado que sempre esteve disponível para ir buscar o material necessário e me aconselhar nos variados procedimentos tomados. Um agradecimento especial ao professor João Sotomayor, do grupo REQUIMTE, por ter permitido um uso contínuo do espectrofotómetro de ultra-violeta e por todos os conselhos e sugestões que me deu durante a realização deste trabalho, e ao professor João Paulo Borges, do grupo CENIMAT, pelo apoio nas medições de viscosidade e na obtenção das imagens em SEM.

Agradeço também às colegas e amigas de laboratório, Susana, Sara F. e Sara V., pelo apoio, pela ajuda prestada e pelo constante interesse pelo meu trabalho. Um agradecimento enorme aos meus amigos, que estiveram sempre disponíveis para me ouvir, Ana, Rita, Joana, Luís, Cláudia, Ana, Joana S. e Liliana.

Agradeço à minha família, aos tios e primos, que estiveram permanentemente disponíveis para mim; à minha irmã, pela cumplicidade, amizade e incentivos constantes; ao meu namorado, pela inesgotável paciência e enorme dedicação durante estes meses de trabalho.

E, para finalizar, um agradecimento gigante aos meus pais, pelo amor e apoio incondicional, por nunca desistirem de me incentivar a continuar e porque é graças a eles que pude chegar aqui.

RESUMO

Em engenharia de tecidos, uma das áreas de interesse é a procura de coberturas para feridas que, simultaneamente, sejam confortáveis para o paciente e eficazes no combate às infecções a que a zona de aplicação está sujeita.

Este trabalho teve como objectivo produzir, por electrofiação de soluções contendo PVP e PVP-I, matrizes de nanofibras e investigar a sua capacidade anti-séptica. Numa primeira fase produziram-se matrizes a partir de soluções com 18% PVP e diferentes concentrações de PVP-I (1%, 3% e 5%). As soluções foram caracterizadas quanto à sua condutividade, densidade, viscosidade e tensão superficial. A morfologia das matrizes de nanofibras foi avaliada por observação em microscópios óptico e electrónico de varrimento (SEM). Após verificar que a reticulação das matrizes ocorre por irradiação com UV na ausência de fotoiniciador, estudou-se a influência do tempo de irradiação na reticulação. Amostras seleccionadas (com diferentes concentrações de PVP-I e irradiadas durante tempos diferentes) foram colocadas em água e foi avaliada, por espectrofotometria de UV-visível, a taxa de libertação do iodo. Foram efectuadas culturas microbiológicas, bacterianas (*S. aureus*, *S. epidermidis* e *P. aeruginosa*) e fúngicas (*C. albicans*) para determinar as concentrações mínimas inibitórias, CMI, correspondentes e avaliar a acção biocida de matrizes reticuladas seleccionadas. Esta avaliação foi feita em culturas microbiológicas confluentes (em agar) em testes de difusão seguindo o método Kirby-Bauer. Os testes revelaram zonas de inibição do crescimento dos microorganismos, o que comprova a eficácia biocida das matrizes. Adicionalmente, foi avaliada a acção biocida de uma matriz colocada numa cultura em meio líquido de *S. aureus*. Este teste indicou uma acção biocida gradual e eficaz.

Palavras chave: electrofiação; reticulação de nanofibras de PVP e PVP-I por UV; espectrofotometria de libertação de iodo; testes de difusão de Kirby-Bauer.

SUMMARY

One of the interest areas of tissue engineering is the development of wound dressings, effective in protecting the wounds from infections and comfortable for the patient.

This study aims to produce nanofiber mats by electrospinning solutions with PVP and PVP-I and to evaluate their antiseptic effectiveness. Initially, mats were produced from solutions with 18% PVP and different concentrations of PVP-I (1%, 3% e 5%). The solutions used were characterized regarding their conductivity, density, viscosity and surface tension. The morphology of the mats was observed using optical and scanning electron microscopy (SEM). After verifying that the mats can be cross-linked with UV irradiation without photo-initiators, the influence of irradiation time on cross-linking degree was studied. Selected samples (with different PVP-I concentrations and irradiation times) were immersed in water. The release rate of iodine was evaluated by UV-visible spectrophotometry. Microbiological cultures - bacterial (*S. aureus*, *S. epidermidis* and *P. aeruginosa*) and fungal (*C. albicans*) - were prepared in order to determine the minimal inhibitory concentrations and to evaluate the biocidal action of selected cross-linked mats. This assessment was made using diffusion tests (Kirby-Bauer method) in confluent microbiological cultures (in agar). These tests revealed growth inhibition zones, proving the effectiveness of biocidal activity of electrospun mats of PVP with PVP-I. Additionally, the biocidal action of electrospun mats in a liquid culture of *S. aureus* was evaluated. This test showed a gradual and effective biocidal action.

Keywords: electrospinning; PVP and PVP-I nanofibrous mats; UV photo cross-linking; spectrophotometry of iodine release; Kirby-Bauer diffusion tests.

LISTA DE ACRÓNIMOS

<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
DO₆₀₀	Densidade Óptica a 600 nm
EtOH	Etanol
LB	Meio de cultura de Levedura (do inglês, <i>Luria-Bertani Broth</i>)
LA	Meio de cultura de Levedura em Agar (do inglês, <i>Luria-Bertani Agar</i>)
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PVP	Poli(vinilpirrolidona) (do inglês, <i>Poly(vinylpyrrolidone)</i>)
PVP-I	Iodopovidona (do inglês, <i>Poly(vinylpyrrolidone)-iodine</i>)
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
SEM	Microscopia Electrónica de Varrimento (do inglês, <i>Scanning Electro Microscope</i>)
SI	Sistema Internacional de Unidades
UFC	Unidade de Colónias Formadas (do inglês, <i>Colony-Forming Unit</i>)
UV	Ultra-Violeta
YM	Meio de cultura de Malte e Peptona (do inglês, <i>Yeast extract-Malt</i>)
YMA	Meio de cultura de Malte e Peptona em Agar (do inglês, <i>Yeast extract-Malt extract Agar</i>)

LISTA DE SÍMBOLOS

α grau de inchamento

γ tensão superficial

λ comprimento de onda

ρ densidade

σ condutividade

\varnothing diâmetro

Conteúdo

Agradecimentos	vii
Resumo	ix
Summary	x
Lista de Acrónimos	xi
Lista de Símbolos	xii
Conteúdo	xiii
Lista de figuras	xv
Lista de tabelas	xvii
1 Introdução	1
1.1 Enquadramento	1
1.2 Anti-sépticos	4
1.2.1 Iodo	4
1.3 Electrofiação	6
1.3.1 Parâmetros	7
1.4 Poli(vinilpirrolidona) e Iodopovidona	12
1.4.1 Poli(vinilpirrolidona)	12
1.4.2 Iodopovidona	12
1.5 Microbiologia	13
1.5.1 Bactérias e fungos	13
2 Materiais e Metodologia	17
2.1 Montagem para produção de matrizes de nanofibras	17
2.2 Composição das soluções	19
2.3 Propriedades físicas das soluções	21

2.3.1	Viscosidade	21
2.3.2	Densidade	21
2.3.3	Tensão superficial	21
2.3.4	Condutividade	22
2.4	Métodos pós-produção	22
2.4.1	Reticulação por irradiação UV	22
2.5	Testes microbiológicos	26
2.5.1	Concentração mínima inibidora	29
2.5.2	Teste Kirby-Bauer ou de difusão em agar	30
2.5.3	Testes de libertação de iodo em cultura	31
3	Apresentação e discussão de Resultados	33
3.1	Influência dos parâmetros de produção nas deposições	33
3.2	Propriedades das soluções	38
3.2.1	Viscosidade	38
3.2.2	Densidade	38
3.2.3	Tensão superficial	38
3.2.4	Condutividade	40
3.3	Processo de electrofiação	42
3.3.1	Parâmetros utilizados	42
3.4	Reticulação por irradiação UV	45
3.4.1	Grau de inchamento	45
3.5	Taxa de libertação de iodo	49
3.6	Testes microbiológicos	53
3.6.1	Curva de crescimento	53
3.6.2	Determinação da concentração mínima inibitória	55
3.6.3	Teste Kirby-Bauer ou de difusão em agar	57
3.6.4	Testes de libertação de iodo em cultura	61
4	Conclusões	65
	Bibliografia	67
A		71
B		74

Lista de figuras

1.1	Diagrama esquemático de um sistema de electrofiação horizontal	7
1.2	Estrutura do PVP	12
1.3	Complexação do PVP com iodo	12
2.1	Sistema de electrofiação utilizado	17
2.2	Sistema de electrofiação utilizado com seringa na bomba	18
2.3	Orifício na caixa por onde passa a agulha da seringa	18
2.4	Aparelho de medição de tensão superficial e condutividade	22
2.5	Aparelho usado para espectrofotometria de UV	24
2.6	Sistema de montagem para espectrofotometria de libertação	25
2.7	Montagem para espectrofotometria de libertação	26
2.8	Esquema das diluições de culturas bacterianas ou fúngicas e plaqueamento . .	29
2.9	Aparelhos utilizados nos testes microbiológicos	30
2.10	Algum material utilizado nos testes microbiológicos	30
3.1	Imagens de SEM de deposições de nanofibras	35
3.2	Imagem de SEM da deposição SEM2 após 2h de irradiação UV	36
3.3	Imagens de MO (ampliação $\times 50$) de deposições de nanofibras	36
3.4	Imagem de MO representativa da não evaporação completa do solvente . . .	37
3.5	Soluções utilizadas ao longo do trabalho: 15% PVP, S0, S1, S3 e S5	38
3.6	Curvas de viscosidade	39
3.7	Representação gráfica dos resultados de densidade	39
3.8	Representação gráfica dos resultados de tensão superficial	40
3.9	Resultados das medições de condutividade	41
3.10	Deposição de fibras em colector vertical da solução S5	43
3.11	Imagens de SEM das matrizes de nanofibras electrofiadas resultantes das soluções S0, S1, S3 e S5	44
3.12	Amostras de filmes nas caixas de poços em seco e em água	45
3.13	Amostras de filmes de F0 e F5 após 2 h UV e hidratadas	46
3.14	Imagens de amostras de matriz de nanofibras de S5 durante o processo da determinação do grau de inchamento	47

3.15	Imagens de filmes antes e após irradiação UV	48
3.16	Grau de inchamento de filmes de F0 e F5 e da matriz obtida através da solução S5	48
3.17	Soluções com concentração crescente de PVP-I em água	49
3.18	Espectros UV de soluções com diferentes concentrações de PVP-I	50
3.19	Absorvância nos comprimentos de onda 361 nm e 292 nm (soluções com diferentes concentrações de PVP-I)	50
3.20	Absorvância nos comprimentos de onda 361 nm e 292 nm numa solução 0,02% PVP-I	51
3.21	Comparação entre curvas de absorvância de soluções com libertação de iodo da matriz de nanofibras	52
3.22	Curva de absorvância a 361nm da libertação do iodo de matrizes de nanofibras para água	52
3.23	Curva de absorvância a 292nm da libertação do iodo de matrizes de nanofibras para água	53
3.24	Curvas de crescimento das estirpes bacterianas e fungo	54
3.25	Balões com culturas	55
3.26	Placa de poços utilizada para testes de CMI	55
3.27	Resultados esquemáticos das placas da CMI com PVP-I	57
3.28	Discos de matrizes de nanofibras da solução S0 e S5 em placas esterilizadas após 4 h de irradiação UV	58
3.29	Resultados dos testes de difusão com solução T05 e matriz de nanofibras de S5 e S0 com 4h UV contra todas as estirpes	59
3.30	Imagens dos testes de difusão contra a estirpe <i>S. aureus</i> com matriz de nanofibras electrofiadas da solução S1, S3 e S5	60
3.31	Imagens dos testes de difusão contra a estirpe <i>S. aureus</i> com soluções de diferentes proporções de PVP-I e de PVP	61
3.32	Material utilizado nos testes de libertação	62
3.33	Balões com cultura <i>S. aureus</i> e matrizes de nanofibras de S0 e S5	63
B.1	Representação esquemática das placas para determinação da CMI com PVP-I	75

Lista de tabelas

1.1	Anti-sépticos (microbiocidas) comuns e respectivos mecanismos de acção . . .	4
1.2	Propriedades do iodo	5
1.3	Principais efeitos dos parâmetros de electrofiação na morfologia das nanofibras (adapt. Bhardwaj (2010))	11
1.4	Picos espectrofotométricos do complexo PVP-I	13
1.5	Incidência no corpo humano de bactérias e fungo	15
2.1	Soluções produzidas durante o projecto	20
2.2	Constituição dos meios de cultura	27
2.3	Estirpes utilizadas nos testes microbiológicos	27
2.4	Soluções produzidas para testes Kirby-Bauer	32
3.1	Parâmetros de processo e ambientais relativos às imagens SEM1 a SEM3 . .	33
3.2	Parâmetros de processo e ambientais relativos às imagens MO5 a MO10 . . .	34
3.3	Resultados obtidos nas medições de viscosidade	38
3.4	Resultados obtidos nas medições de densidade	40
3.5	Resultados obtidos nas medições de tensão superficial	40
3.6	Resultados obtidos nas medições de condutividade	40
3.7	Propriedades físicas das soluções S0, S1, S3, S5 e 15% PVP	41
3.8	Parâmetros de processo e ambientais para a electrofiação de cada solução . .	43
3.9	Correspondência entre DO ₆₀₀ e UFC	55
3.10	Diluições de PVP-I	56
3.11	Resultados CMI de PVP-I	56
3.12	Resultados dos testes de difusão contra todas as estirpes com solução T05 e matriz de nanofibras de S5 com 4h UV	59
3.13	Resultados dos testes de difusão contra a estirpe <i>S. aureus</i> com matriz de nanofibras de S5 com diferentes tempos de irradiação UV	59
3.14	Resultados dos testes de difusão contra a estirpe <i>S. aureus</i> com matriz de nanofibras de S0, S1 e S5 com 4 horas de irradiação UV	60
3.15	Resultados dos testes de difusão contra a estirpe <i>S. aureus</i> com diferentes soluções de PVP e PVP-I	60

3.16 Resultados do teste de liberação de iodo da matriz de nanofibras de S5 contra a estirpe <i>S. aureus</i>	62
--	----

Capítulo 1

Introdução

1.1 Enquadramento

A electrofiação é uma técnica simples, versátil, de baixo custo [1] que permite produzir fibras com diâmetros na ordem dos nanómetros (nanofibras) a partir de soluções poliméricas. As matrizes de nanofibras resultantes desta técnica de fiação possuem porosidade e razão superfície/volume elevadas. Estas características tornam-nas semelhantes à matriz extracelular dos tecidos biológicos e adequadas à cobertura de feridas cutâneas por permitirem as necessárias trocas gasosas, contribuirem para a correcta manutenção de líquidos (absorção do exsudado) e impedirem a penetração de microorganismos. Além disso, as nanofibras podem servir como reservatório para a libertação controlada de fármacos, tais como agentes biocidas.

O iodo é um agente biocida usado, sob a forma de soluções, como desinfectante e anti-séptico pré-operatório. A sua utilização em feridas requer uma entrega lenta que não implique sobredosagem e garanta uma eficácia prolongada no combate às infecções. Da complexação do iodo com a polivinilpirrolidona, PVP, resulta o PVP-I. Anti-sépticos à base de PVP-I libertam iodo de forma sustentada.

O PVP é um polímero sintético, biocompatível e hidrofílico, solúvel em água. No entanto, é possível torná-lo insolúvel (reticulá-lo) por irradiação com ultravioleta, utilizando-se, normalmente, fotoiniciadores de reacção.

Desde que, em 1934, Antonin Formhals patenteou o processo de electrofiação[2], foram realizados muitos trabalhos de pesquisa e desenvolvimento recorrendo a esta técnica. Em inglês, *electrospinning* resulta da aglutinação dos vocábulos *electrostatic* e *spinning* [2, 3], isto é, fiação electrostática.

Em 2008, Ignatova M. [4] estudou a possibilidade de fabricar, por electrofiação, matrizes de nanofibras contendo o polímero PVP-I (iodopovidona ou *poly(vinyl)pyrrolidone-iodine*, em inglês). Este complexo polimérico é utilizado em inúmeros produtos farmacêuticos, devido às propriedades antibacterianas, antimicóticas e antivirais do iodo que incorpora. Ignatova M. seguiu duas estratégias: numa, procedeu à complexação do iodo com PVP (polivinilpirroli-

dona ou *poly(vinyl)pyrrolidone*, em inglês), electrofiando, de seguida, o complexo[5]; noutra, complexou o iodo em fibras de PVP obtidas por electrofiação e já reticuladas (tornadas insolúveis) por irradiação com UV (ultra-violeta)[4]. Foi com as matrizes obtidas por este segundo método que efectuou estudos para determinar a acção biocida das matrizes[4]. Tendo em vista a reticulação das matrizes de PVP, Ignatova M. incorporou, na solução que electrofiou, um fotoiniciador (DAS, *4,4'-diazidostilbene-2,2'-disulfonic acid disodium salt*, em inglês) com elevada toxicidade para o Homem. Estes estudos permitiram concluir que matrizes de PVP, reticuladas por UV com recurso a um fotoiniciador, depois de se proceder à complexação com iodo, têm potencial para poderem ser utilizadas como revestimento de feridas.

Tendo em conta o que já foi apresentado, foram definidos os seguintes objectivos:

- produzir, por electrofiação, matrizes de nanofibras a partir de soluções aquosas contendo PVP-I comercial. Devido à baixa massa molecular deste produto, as soluções usadas incorporam ainda PVP por forma a torná-las processáveis;
- determinar a eficácia da reticulação das matrizes de nanofibras por irradiação com UV (sem recurso a fotoiniciadores) em função do tempo;
- determinar a taxa de libertação do iodo existente nas matrizes reticuladas para água destilada através de espectrofotometria UV;
- e, finalmente, determinar a actividade biocida das matrizes em culturas microbiológicas.

Assim sendo, esta dissertação foi organizada em 4 capítulos.

No **capítulo 1**, o actual, é descrito o enquadramento teórico do trabalho. Após a definição de anti-sépticos e seus mecanismos de acção, é apresentado o anti-séptico iodo, responsável pela acção biocida das matrizes de nanofibras produzidas neste trabalho. É então descrita a técnica de electrofiação e os parâmetros que são necessários ter em conta para utilizar eficazmente esta técnica de produção de matrizes de nanofibras. É neste capítulo que também são introduzidos os polímeros utilizados neste trabalho (PVP, polivinilpirrolidona, e PVP-I, iodopovidona) para produzir as soluções precursoras das matrizes de nanofibras electrofiadas e, finalmente, proceder-se-á a uma descrição das estirpes bacterianas e fúngica utilizadas nos testes microbiológicos.

No **capítulo 2** pode ser observada a montagem utilizada para o processo de electrofiação e são apresentadas as soluções produzidas ao longo do trabalho, sendo também introduzidos os parâmetros estudados sobre as mesmas. São explicados os métodos de pós-produção de matrizes de nanofibras: a reticulação por irradiação UV, sem recurso a fotoiniciadores, e a definição do grau de inchamento das matrizes após imersão das mesmas em água, e a espectrofotometria de UV para estudar a libertação de iodo, para água, a partir de matrizes de nanofibras reticuladas. Considerando o último item deste capítulo, após ser explicada a determinação da concentração mínima inibitória de PVP-I necessária para inibir a proliferação

dos microorganismos testados, são introduzidos os dois métodos utilizados para estudar a eficácia biocida das matrizes de nanofibras produzidas: os testes de difusão (Kirby-Bauer) por discos de matrizes e por discos de papel de filtro embebidos em soluções e o teste de libertação de iodo em cultura, efectuado de modo a estudar a eficácia das matrizes de nanofibras em contacto contínuo com as estirpes em meio líquido. Este último foi efectuado para uma única estirpe bacteriana.

O **capítulo 3** é dedicado à apresentação e discussão dos resultados. São apresentados os parâmetros utilizados na produção das matrizes e as propriedades das soluções que foram produzidas. São também descritos os problemas encontrados durante o processo de electrofiação e podem ser observadas as matrizes de nanofibras produzidas. São então apresentados os resultados obtidos na reticulação de filmes e das matrizes por UV, que foi conseguida sem recurso a fotoiniciadores. Relativamente ao estudo da taxa de libertação de iodo, podem ser observados os resultados da espectrofotometria de soluções com várias concentrações de PVP-I e da comparação destes com os resultados da espectrofotometria de libertação de iodo para água, sendo que este teste foi efectuado para matrizes com diferentes tempos de reticulação, com vista a determinar o melhor tempo de reticulação para uma libertação gradual do iodo para água. No item sobre os testes microbiológicos, são apresentados os resultados relativos às curvas de crescimento dos microorganismos testados, à determinação da concentração mínima inibitória e aos estudos efectuados para determinar a eficácia biocida das matrizes de nanofibras: os testes de Kirby-Bauer e os de libertação de iodo em cultura.

Finalmente, no **capítulo 4** são apresentadas as principais conclusões que se podem retirar deste trabalho e as perspectivas futuras para a continuação deste trabalho.

1.2 Anti-sépticos

Um anti-séptico é, segundo o *Dicionário da Língua Portuguesa*, a “substância que combate as infecções e a putrefacção por acção germicida” [6].

Um anti-séptico ideal para aplicação cutânea deve ter largo espectro de actividade microbiocida e baixa toxicidade [7], possuindo a capacidade de degradar ou inibir a proliferação dos microorganismos patogénicos normalmente existentes na flora cutânea. Deve, também, ser eficaz logo após a exposição e ser estável quimicamente, não se degradando pela temperatura ou exposição solar. Os anti-sépticos podem dividir-se em microbiocidas, se destroem o agente patogénico, e em microbiostáticos, se apenas inibem o seu crescimento. Os microbiocidas podem actuar desnaturando as proteínas ou provocando a ruptura osmótica do microorganismo patogénico (ver tabela 1.1), enquanto que os microbiostáticos interferem nos processos metabólicos, impedindo, assim, o crescimento e proliferação do agente patogénico.

Tabela 1.1: *Anti-sépticos (microbiocidas) comuns e respectivos mecanismos de acção*[8]

Anti-sépticos	Substâncias comuns	Mecanismo de acção específica
Álcoois	Etanol e Isopropanol	Desnaturação proteica
Clorhexidina	Gluconato de clorhexidina	Ruptura osmótica
Aldeídos	Glutaraldeído	Desnaturação proteica
Iodo	Soluções aquosas de iodo	Ruptura osmótica
Iodóforos	Iodopovidona (PVP-I)	Ruptura osmótica
Prata	Nitrato de prata e Sulfadiazina de prata	Desnaturação proteica

1.2.1 Iodo

As propriedades e características do iodo estão referidas nesta secção, de acordo com o INCHEM: ICSC (*International Programme on Chemical Safety: International Chemical Safety Cards*) (ver referências [9, 10]), excepto indicação contrária.

O iodo é um halogéneo de número atómico 53. De entre os vários isótopos conhecidos do iodo, apenas o ^{127}I é estável. O seu isótopo ^{131}I é utilizado no diagnóstico e tratamento do hipertiroidismo e disfunções gerais da tiróide. O iodo encontra-se na natureza no estado sólido, em rochas vulcânicas, e no mar, integrando compostos orgânicos produzidos por diversas formas de vida marinha. O sólido, de cor azul acinzentada, tem estrutura cristalina ortorrômbica com moléculas de I_2 (iodo elementar) ocupando os lugares da rede.

Em solução aquosa estabelecem-se os seguintes equilíbrios químicos entre as espécies do iodo:

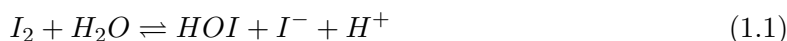


Tabela 1.2: *Propriedades do iodo*[9]

M_w	253.81
T_m (°C)	113.60
ρ (g/cm ³)	4.9
Solubilidade (em água)	1:3500
Solubilidade (em álcool)	1:8
Solubilidade (em éter)	1:5

Na tabela 1.2, são apresentadas algumas propriedades do iodo elementar (peso molecular, M_w , temperatura de fusão, T_m , densidade, ρ , e solubilidade em vários solventes). Como se pode verificar, a solubilidade do iodo em água é muito baixa. A presença de sais de iodo (como o iodeto de potássio, KI) aumenta a solubilidade do iodo elementar em soluções aquosas (solução de Lugol) ou alcoólicas (tintura de iodo) por conduzir à formação do ião triiodeto, I_3^- . Soluções de iodo em álcool, éter ou água apresentam cor castanha-avermelhada e em clorofórmio, tetracloreto de carbono ou disulfureto de carbono apresentam cor violeta.[9]

A acção biocida do iodo deve-se a três (das quatro) espécies que se formam em solução aquosa: I_3^- , I_2 e HOI. A espécie I_2 é a principal responsável por esta acção, tendo Punyani S. (2005)[11] referido que a espécie HOI é responsável por metade e que a espécie I_3^- tem somente 1/8 da capacidade biocida do I_2 . Ao entrar em contacto com os microorganismos (i.e., bactérias, fungos e vírus), estas formas de iodo livre reagem com as enzimas da cadeia respiratória e com os aminoácidos das proteínas das suas membranas celulares, o que resulta numa destruição irreversível do microorganismo [4].

O iodo é frequentemente usado como desinfectante, anti-séptico pré-operatório, no tratamento de herpes e na purificação de água[12], dado que possui actividade microbiocida (por exemplo, tintura de iodo a 1% destrói 90% de uma população de bactérias em 90 s; se a concentração aumentar para 5%, este tempo baixa para 60 s e para uma concentração de 7%, é de apenas 15 s).

A dosagem terapêutica de iodo indicada para adultos como desinfectante da pele pode variar entre 10 a 25 mg/g, por vezes em combinação com potássio ou iodeto de sódio. A informação sobre os valores de dose letal para o corpo humano é reduzida. Os valores encontrados referem-se à dose letal baixa LD₅₀ (do inglês, *lethal dose low*), ou seja, à dose mais baixa de substância capaz de provocar a morte (o valor está definido em massa de substância por unidade de massa do organismo). Por ingestão, a LD₅₀ do iodo é de 28mg/kg [13].

Numa aplicação em pele não lesada, a absorção de iodo limita-se a pequenas quantidades. A absorção dérmica ocorre em úlceras cutâneas (lesões superficiais do tecido cutâneo), sendo tanto maior quanto maior for a área lesada. Numa aplicação tópica, o iodo também pode

ser absorvido no contacto com superfícies mucosas com elevada capacidade de absorção. O iodo é excretado do corpo humano principalmente pela urina, mas também, em quantidades inferiores, pela saliva e noutras secreções.

As soluções de iodo para uso tópico devem ser armazenadas em recipientes protectores da luz solar (para que a sua estrutura não seja alterada) e, dado que o iodo volatiliza lentamente à temperatura ambiente, devem ser mantidos a temperaturas inferiores a 35°C. A tintura de iodo deve ser armazenada em recipientes hermeticamente fechados. Dever-se-á ainda ter em conta a elevada toxicidade e inflamabilidade dos vapores de iodo, pelo que o local onde se armazenam estes compostos deve ser fresco, seco e bem ventilado.

1.3 Electrofiação

A electrofiação é uma técnica de produção de fibras poliméricas contínuas com diâmetros que variam entre os nanómetros e os micróns [14], designadas por nanofibras, e que possuem uma elevada razão superfície/volume.

A matriz extracelular da maior parte dos tecidos biológicos tem uma estrutura fibrosa, porosa e que apresenta uma elevada superfície exposta. As deposições de nanofibras têm uma estrutura semelhante à desta matriz extracelular. Possuem boa permeabilidade ao oxigénio e capacidade de absorção de fluidos se o material que as constitui for hidrofílico. O tamanho reduzido dos seus poros é uma vantagem para a aplicação em cobertura de feridas, pois previne a penetração de microorganismos e as infecções [4, 5].

As matrizes de nanofibras têm sido exploradas para variadas aplicações[3], tais como membranas multifuncionais, elementos estruturais de substitutos de tecidos humanos e órgãos artificiais [4, 15], transporte e entrega de drogas [5], filtros industriais para separação de partículas submicrométricas, estruturas para nano-equipamentos electrónicos, etc.

Além de todas as possíveis aplicações e do reduzido custo que envolve[1], a electrofiação é um processo simples de implementar do ponto de vista do equipamento que requer. No processo, as fibras são produzidas graças ao estiramento causado por forças electrostáticas num jacto de uma solução polimérica [2, 16, 17].

O sistema de electrofiação (figura 1.1) é composto por 3 componentes principais - uma fonte de alta tensão, um capilar metálico (normalmente uma agulha colocada na ponta de uma seringa que contém a solução polimérica), ao qual se liga a fonte, e um prato colector ligado à terra [2]. Usualmente, existe também uma bomba injectora, que é utilizada para controlar o fluxo a que a solução polimérica é ejectada para a região onde fica sujeita ao campo eléctrico. Este, por sua vez, conduz a solução polimérica em direcção ao prato colector. Normalmente, a electrofiação é efectuada às condições atmosféricas ambientes (temperatura e humidade relativa são importantes factores que influenciam o processo [18]).

No processo da electrofiação, a solução polimérica encontra-se na seringa e é empurrada

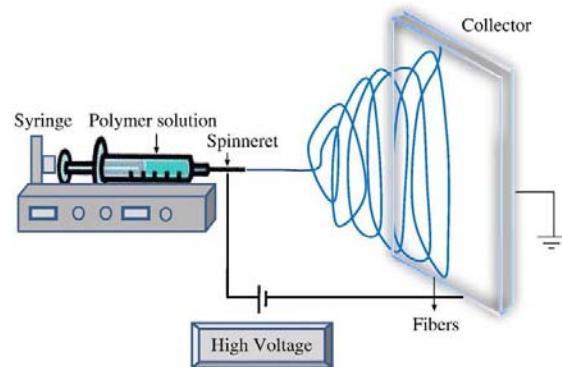


Figura 1.1: Diagrama esquemático de um sistema de electrofiação horizontal [2]

para a agulha pelo êmbolo a uma velocidade constante, estabelecendo-se, desta forma, o fluxo a que a solução sai da agulha. A agulha está sujeita à tensão definida na fonte de alta tensão, tal como o polímero. Esta ligação estabelece um campo electrostático entre a agulha e o prato colector [19] e permite carregar o polímero.

Para valores reduzidos da tensão aplicada, quando a solução polimérica começa a fluir, forma-se uma gota na ponta da agulha devida à tensão superficial da solução. À medida que a tensão imposta pela fonte for aumentada, as forças de Coulomb que actuam na gota provocam a sua distorção e ela adquire a forma de um cone - o cone de Taylor.

Para um valor crítico da tensão aplicada, as forças electrostáticas vencem a tensão superficial e, da ponta do cone de Taylor, é ejectado um jacto polimérico que é conduzido pelo campo eléctrico em direcção ao colector. Inicialmente, o jacto pode ter um percurso em linha recta, mas rapidamente começa a serpentear (devido às forças autorepulsivas no polímero carregado), adquirindo uma forma caótica. Durante este percurso, o solvente evapora e o jacto distende. Esta distensão provoca uma diminuição no diâmetro. Ao atingir o prato colector, o diâmetro do fio polimérico é frequentemente submicrométrico [2, 20, 21].

1.3.1 Parâmetros

A qualidade da deposição resultante da electrofiação depende dos parâmetros que afectam o processo. Podem-se considerar três tipos de parâmetros [2, 17]:

- parâmetros do processo - tensão aplicada [22], fluxo da solução e distância entre a agulha e o colector [2, 3, 19, 23];
- parâmetros da solução - dependem da composição da solução e das propriedades de cada um dos seus constituintes (tais como, concentração polimérica e peso molecular) e compreendem as propriedades das soluções que directamente influenciam o processo (viscosidade, tensão superficial e condutividade) [2, 3, 16, 19, 23–25];

- parâmetros ambientais - temperatura e humidade [2, 3, 18].

Os dois primeiros tipos de parâmetros são intrínsecos ao processo, enquanto que os parâmetros ambientais são extrínsecos.

1. Parâmetros do processo

- **Tensão aplicada**

A tensão aplicada determina a carga fornecida ao polímero e, quanto maior a carga, maior a autorepulsão responsável pela distensão (ou alongamento) do jacto [22]. Isto contribuiria para o menor diâmetro das fibras se o tempo de voo se mantivesse e enquanto as fibras ainda retivessem solvente. Com as fibras secas, o estiramento não continua. A tensão aplicada, conjuntamente com a distância entre a agulha e o colector, determina também a intensidade do campo electrostático entre a agulha e o colector. Quanto maior a diferença de potencial entre agulha e prato colector, maior o campo eléctrico e, consequentemente, menor é o tempo de voo. A diminuição do tempo de voo contribui para que as fibras não continuem o seu estiramento. Dependendo do balanço entre os efeitos atrás descritos, o diâmetro das fibras pode ou não ser reduzido pelo aumento de potencial.

Além disso, o aumento da carga associado a um aumento de tensão pode contribuir para se formarem feixes múltiplos [22], ou seja, para que sejam ejectados vários feixes, ou jactos, de polímero da gota na ponta da agulha.

- **Fluxo**

O fluxo determina a disponibilidade de solução que vai chegando à ponta da agulha. Com um fluxo mais elevado, o diâmetro das fibras aumenta [2] e, se for demasiado elevado, isto é, se o campo eléctrico não for suficiente para conseguir retirar da região da agulha toda a solução que aí chega, acumular-se-á solução na ponta da agulha [16]. Por outro lado, se o fluxo for demasiado baixo neste mesmo critério, podem ocorrer interrupções no jacto. Pode então dizer-se que, e citando Rutledge (2007) [20], “para um dado fluido existe um intervalo de voltagem e fluxo em que o processo de electrofiação é estável”.

- **Distância**

A influência da distância no campo electrostático é inversa à influência da tensão, pois, quando a distância diminui, o campo aumenta. Este não é, no entanto, o efeito mais relevante. Efectivamente, ao diminuir a distância, o tempo de voo tem tendência a diminuir e o solvente pode não ter tempo de evaporar, pelo que as fibras depositadas não são cilíndricas e são grossas. É necessário um mínimo de distância para que haja evaporação do solvente durante o tempo de voo [2].

2. Parâmetros da solução

Para electrofiar um polímero é necessário dissolvê-lo num solvente. O solvente deve ser adequadamente escolhido, devendo ser volátil o suficiente para evaporar durante o tempo de voo do jacto (devem ter-se em conta a sua pressão de vapor e ponto de ebulição). Um solvente pode degradar rapidamente um polímero, o que também deve ser tido em conta [2].

As propriedades da solução que influenciam directamente o processo de electrofiação, e de que se falará a seguir, dependem da constituição da mesma e das propriedades dos seus constituintes. Por exemplo, aumentar a concentração de etanol num solvente à base de água provoca uma diminuição da tensão superficial da solução, além de aumentar a taxa de evaporação do solvente [24].

- **Viscosidade**

A viscosidade está directamente correlacionada com a concentração e com o peso molecular do polímero [2] - quanto maior a concentração de um polímero com determinada massa molecular, maior é a viscosidade da solução e, quanto maior for a massa molecular do polímero, maior é a viscosidade para uma mesma concentração. A viscosidade da solução depende ainda do polímero e do solvente usados na solução e da temperatura a que esta se encontra. A viscosidade é um parâmetro da solução determinante no processo de electrofiação e na morfologia das fibras. As forças viscoelásticas, dependentes da viscosidade, opõem-se ao estiramento do jacto polimérico e impedem a formação de contas (que são pequenas aglomerações, ou glóbulos, nas fibras) [2] devidas à tensão superficial. A viscosidade permite que o jacto possa ser estirado sem quebrar. Se a viscosidade for muito baixa, não é possível a formação de uma fibra contínua, no entanto, se for demasiado elevada, é necessária uma tensão aplicada elevada para dar origem ao jacto [2]. Quando a viscosidade é reduzida (mas suficiente para haver formação de jacto), com os outros parâmetros fixos, obtêm-se fibras de menor diâmetro e mais uniformes [26]. Um aumento da viscosidade reduz a probabilidade de formação de contas [3, 19, 24].

- **Condutividade**

A condutividade mede a capacidade de uma solução conduzir cargas. No processo de electrofiação, as soluções altamente condutoras são muito instáveis na presença de campos eléctricos fortes, havendo ocorrência de jactos múltiplos, devido à excessiva repulsão entre cargas em elementos adjacentes do polímero [2].

Quando há um aumento de carga em soluções condutoras, ocorre uma maior repulsão entre elementos adjacentes do polímero, sendo, assim, maior o estiramento do polímero. Deste modo, quanto maior a condutividade, menor é o diâmetro das fibras [2, 3] e menor é a probabilidade de aparecerem contas [24, 26]. As contas

surgem quando a tensão superficial domina sobre as forças que provocam o estiramento, como veremos a seguir, aumentando a probabilidade de ocorrência de contas nas fibras e de *electrospray* - formação de gotas em vez de um fio polimérico.

- **Tensão superficial**

A tensão superficial está directamente relacionada com o polímero e com o solvente usados, mas depende principalmente deste último [24]. Esta força resulta das interações intermoleculares das moléculas na superfície do fluido e tem como efeito a diminuição da razão volume/superfície de um fluido, de modo a que se tenha uma menor energia total de um sistema. Assim, quanto maior a tensão superficial de um fluido, maior é a coesão das suas moléculas à superfície. Uma tensão superficial elevada provoca instabilidade no processo de electrofiação [2], dado que a liberdade de movimentação das suas moléculas carregadas é limitada, ou seja, a elevada coesão entre as moléculas não permite que a repulsão entre elementos adjacentes do polímero ocorra eficazmente, não havendo estiramento do polímero durante o voo. Deste modo, o polímero é depositado sob a forma de gotas (*electrospray*) ou sob a forma de fibras com contas. Uma tensão superficial reduzida diminui a probabilidade de obter fibras com contas [2, 24] e facilita a ocorrência do processo com tensões aplicadas mais reduzidas [2].

3. Parâmetros ambientais

- **Temperatura**

As propriedades de uma solução dependem da sua temperatura, tal como a taxa de evaporação do solvente da solução. Demir (2002) [25] afirma que o aumento de temperatura melhora a uniformidade das fibras e torna o processo mais rápido: o aumento de temperatura diminui a viscosidade (formando-se fibras mais uniformes, como explicado no parâmetro da viscosidade) e, por conseguinte, as forças viscoelásticas que impedem o estiramento. Havendo uma diminuição das forças viscoelásticas, pode-se diminuir a tensão aplicada ou aumentar o fluxo, aumentando a quantidade de polímero depositado no prato colector por unidade de tempo.

Em geral, quanto maior a temperatura, maior é a taxa de evaporação de um solvente. No processo de electrofiação, o solvente deve ser suficientemente volátil para evaporar durante o tempo de voo do jacto (garantindo que as fibras não percam a sua forma cilíndrica no impacto com o colector). Mas, se a evaporação for rápida, a viscosidade do jacto aumenta durante o tempo de voo, o que dificulta o seu estiramento. Se for demasiado rápida, pode até impedir o processo de electrofiação, por causar a secagem da gota na ponta da agulha.

- **Humidade**

A evaporação de um solvente à base de água é inversamente proporcional à humidade. Se a humidade for muito baixa e o solvente usado for apenas água, a evaporação pode ser tão rápida que o polímero seca na gota na ponta da agulha, impedindo o processo de ocorrer [2]. Com o aumento da humidade relativa, a taxa de evaporação é mais lenta, ou seja, o jacto demora mais tempo a solidificar e o estiramento ocorre durante mais tempo, permitindo a formação de fibras mais finas [18]. A partir de um certo valor de humidade relativa, começa a haver formação de contas, dado que, por haver maior estiramento do que diminuição da taxa de evaporação, ocorre um aumento da razão área/superfície, que é contrariada pela tensão superficial [18]. A partir desse valor, a presença de contas nas fibras é tanto maior quanto maior for a humidade relativa.

Na tabela 1.3, estão sumariadas as principais consequências da variação de cada um dos parâmetros que afectam o processo de electrofiação. É necessário, no entanto, referir que o processo de electrofiação depende da conjugação de todos eles, ou seja, os efeitos de cada parâmetro dependem dos outros parâmetros. Assim sendo, a tabela refere apenas o efeito principal da alteração do respectivo parâmetro, que pode não se verificar, caso outras alterações se sobreponham.

Tabela 1.3: *Principais efeitos dos parâmetros de electrofiação na morfologia das nanofibras (adapt. Bhardwaj (2010))*

Parâmetros	Efeitos na morfologia das nanofibras
do processo	
Tensão	Diminuição no diâmetro das fibras com o aumento da voltagem
Fluxo	Diminuição no diâmetro das fibras com a diminuição do fluxo
Distância entre a agulha e o colector	A probabilidade de surgirem contas nas fibras aumenta com a distância. É necessária uma distância mínima para o solvente evaporar.
da solução	
Viscosidade	Reduzida: podem surgir contas. Aumento do diâmetro das fibras com o aumento da viscosidade, que contribui para o desaparecimento das contas
Condutividade	Redução no diâmetro das fibras com o aumento de condutividade
Tensão superficial	Tensão superficial elevada pode resultar na formação de contas ou apenas gotas (<i>electrospray</i>), em vez de um fio polimérico (<i>electrospinning</i>).
ambientais	
Temperatura	Aumento da temperatura resulta em diminuição do diâmetro das fibras, na medida em que diminui a viscosidade
Humidade	Elevada humidade resulta em poros circulares nas fibras; ocorre diminuição da taxa de evaporação em soluções aquosas, o que atrasa a solidificação do jacto e forma fibras mais finas. A partir de um determinado valor elevado de humidade, começam a aparecer contas nas fibras.

1.4 Poli(vinilpirrolidona) e Iodopovidona

Um polímero resulta do estabelecimento de ligações covalentes entre várias (desde a dezena até um número ilimitado) unidades idênticas que, assim, formam cadeias. A unidade repetida do polímero denomina-se monómero [27].

Poli(vinilpirrolidona) (PVP) é um polímero amorfo formado por cadeias, como se representa na figura 1.2. Apesar do monómero ser tóxico e cancerígeno, o PVP apresenta baixa toxicidade [4, 28], isto é, apresenta uma boa biocompatibilidade.

Um polímero biocompatível é aquele que, quando em contacto com os tecidos biológicos, não provoca danos significativos (os que eventualmente ocorram são reversíveis) [29].

1.4.1 Poli(vinilpirrolidona)

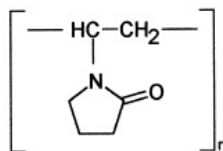


Figura 1.2: Estrutura do PVP [28]

O PVP é um polímero hidrofílico, o que pode contribuir para que uma matriz de nanofibras baseadas em PVP, usada para revestimento de feridas, estabeleça uma hidratação adequada, possuindo, ao mesmo tempo, a capacidade de absorver a exsudação da mesma. A hidratação da ferida deve ser constante e suficiente, de modo a evitar a formação de crostas ou cicatrizes e a permitir que a cicatrização ocorra do interior para o exterior da ferida[30].

O PVP é, ainda, um polímero solúvel em água, que pode tornar-se menos solúvel através da reticulação por radiação UV [31].

O PVP é conhecido por formar um complexo estável com o I_2 [32] - a iodopovidona (PVP-I).

1.4.2 Iodopovidona

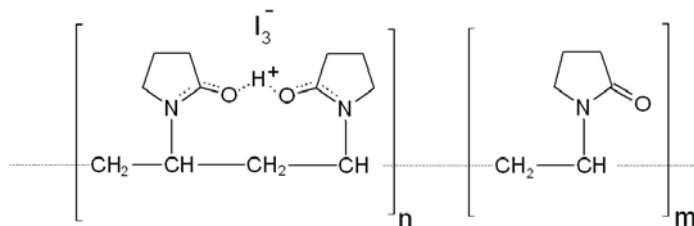


Figura 1.3: Complexação do PVP com iodo[33]

A complexação pode envolver os iões I_3^- [28], I_5^- e I_2 [1]. Os espectros de UV-visível (UV-vis) de soluções aquosas de PVP-I apresentam picos devidos a várias espécies de iodo. A correspondência está indicada na tabela 1.4 [1].

Tabela 1.4: *Picos espectrofotométricos do complexo PVP-I*

$\lambda(\text{nm})$	Espécie
200–250	I^-
290	I_3^-
350	I_3^-
460	I_2

Apesar de possuir uma actividade antimicrobial de largo espectro, o PVP-I é um não antibiótico (não envolve substâncias produzidas por microorganismos antagonistas do crescimento de outros microorganismos) [1] com propriedades anti-sépticas [7, 34]. É o ingrediente activo da conhecida *Betadine*. A acção microbiocida do PVP-I está relacionada com a libertação de iodo livre do complexo [4]. Em contacto com a pele e as membranas mucosas, comporta-se como um iodoformo¹ eficiente no tratamento de feridas, úlceras e queimaduras.

A iodopovidona, tipicamente com cerca de 10% de iodo activo, apresenta baixa toxicidade em feridas e membranas mucosas [4] e, além disso, devido à relativamente lenta libertação do iodo, não interfere negativamente no processo de cicatrização das feridas, tal como acontecia com as tinturas de iodo.

Ignatova, M. (2008) [4] concluiu que matrizes de nanofibras de PVP nas quais complexou iodo apresentavam actividade bactericida, ao contrário de matrizes de PVP sem iodo complexado. Esta actividade foi observada após o contacto das matrizes com as bactérias *S. aureus*, *E. coli* e com o fungo *C. albicans*. As matrizes que continham iodo complexado tiveram elevada actividade bactericida e fungicida e preveniram qualquer posterior adesão celular.

1.5 Microbiologia

1.5.1 Bactérias e fungos

As bactérias são microorganismos unicelulares. Os agentes antimicrobianos que penetram na célula bacteriana podem destruí-las ou inibir a sua multiplicação.

Os agentes bacteriostáticos, por exemplo, inibidores da síntese proteica, interferem com mecanismos moleculares ou celulares e actuam por ligação aos ribossomas, de modo a inibir a proliferação (não ocorrendo, no entanto, morte celular); os agentes bactericidas induzem a morte das células, mas sem provocar a ruptura e a destruição da estrutura física da célula (não ocorre lise celular) e os agentes bacteriolíticos provocam a lise celular, o que resulta em morte

¹o termo iodoformo significa que o iodo activo vai sendo libertado ao longo do tempo

celular. Os antibióticos, como é o caso da penicilina, são exemplos de agentes bacteriolíticos, pois inibem a síntese da parede celular em bactérias [35].

Neste trabalho foram utilizadas as seguintes estirpes de bactérias: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Pseudomonas aeruginosa*.

O género *Staphylococcus* pertence à família Micrococcaceae. Estruturalmente, são esferas imóveis com diâmetro entre 0,5 e 1,5 μm . O metabolismo é respiratório e fermentativo e são anaeróbios facultativos, crescendo mais rapidamente em ambientes aeróbios, com temperaturas óptimas entre 35 e 40°C. Uma das espécies deste género com relevância clínica é *Staphylococcus aureus* [36].

O género *Pseudomonas* pertence à família Pseudomonadaceae. Estruturalmente, são bacilos isolados, rectos ou encurvados, de dimensões de 0,5 a 1,0 μm por 1,4 a 4 μm , e movem-se através de flagelos polares. São gram negativos aeróbios e têm metabolismo respiratório, nunca fermentativo. Uma das espécies deste género com relevância clínica é *Pseudomonas aeruginosa* [36].

As leveduras são fungos unicelulares que não apresentam micélios característicos [36]. Neste trabalho, foi utilizada a levedura patogénica *Candida albicans*.

No género *Candida*, as células podem ter várias morfologias. Possui pseudomicélio e pode ocorrer a formação de micélio verdadeiro e clamidósporos. O metabolismo pode ser oxidativo, mas, em algumas espécies, é bastante fermentativo [36]. O fungo *Candida* pertence à subdivisão *Deuteromycotina*, classe *Deuteromycetes*, subclasse *Blastomycetidae* e ordem *Cryptococcales* [37].

Com excepção de *P. aeruginosa*, as bactérias e fungo referidos anteriormente colonizam habitualmente o organismo humano, podendo-se considerar parasitas indígenas [36]. As infecções provocadas por estes microorganismos ocorrem quando a concentração celular aumenta por as defesas do corpo humano se encontrarem enfraquecidas ou por ocorrer uma invasão, como pode acontecer no caso de uma ferida na pele. Na tabela 1.5, encontram-se as incidências típicas de cada um dos microorganismos referidos em várias regiões anatómicas no corpo humano, isto é, a percentagem de todos os colonizadores de determinada região anatómica que corresponde a determinado microorganismo.

Tabela 1.5: Incidência no corpo humano das bactérias *S. aureus* e *S. epidermidis* e fungo *C. albicans* (adapt.) [36]

Região anatômica	Microorganismo	Incidência (%)
Pele	<i>S. epidermidis</i>	85-100
	<i>S. aureus</i>	5-25
Nariz e nasofaringe	<i>S. epidermidis</i>	90
	<i>S. aureus</i>	20-85
Orofaringe	<i>S. epidermidis</i>	30-70
	<i>S. aureus</i>	35-40
Boca (Saliva e superfícies dentárias)	<i>S. epidermidis</i>	75-100
	<i>S. aureus</i>	comum
	<i>C. albicans</i>	6-50
Jejuno	<i>C. albicans</i>	20-40
Intestino grosso	<i>C. albicans</i>	15-30
Vagina e colo do útero	<i>S. epidermidis</i>	35-80
	<i>S. aureus</i>	30-50

Capítulo 2

Materiais e Metodologia

2.1 Montagem para produção de matrizes de nanofibras

Na figura 2.1 pode-se observar o sistema de electrofiação utilizado na produção de matrizes de nanofibras.



Figura 2.1: Sistema de electrofiação utilizado

Os principais elementos do sistema são uma fonte de alta tensão (construída no laboratório) capaz de aplicar uma tensão máxima de 30 kV, uma bomba injetora (*NE-300 “Just Infusion” Syringe Pump da New Era Pump Systems, Inc.*), e um prato colector metálico vertical. O colector está ligado à terra e pode ter movimento de rotação e de translação na horizontal. Estes movimentos permitem obter deposições com espessuras mais uniformes do que as obtidas num colector estático. O colector está colocado no interior de uma caixa feita de acrílico que possui um sistema de extracção para o exterior do laboratório (importante

quando se usam solventes com alguma toxicidade, o que não aconteceu neste trabalho) e permite que se possa efectuar um certo controlo sobre os parâmetros ambientais (temperatura e humidade) sob os quais decorre o processo - com o fluxo de ar comprimido, é possível diminuir a humidade e, com uma manta de aquecimento, aumentar a temperatura. Um medidor de temperatura e humidade, colocado no interior da caixa, monitoriza estes parâmetros.

A seringa (BRAUN, diâmetro interno 12,74 mm), com a solução polimérica a fiar, coloca-se na bomba injectora e a agulha, na sua extremidade, passa por um orifício da caixa para o seu interior (figura 2.3), onde é ligada à fonte de alta tensão através de um crocodilo (ver figura 2.2).

O esquema utilizado está de acordo com a imagem 1.1, secção 1.3.



Figura 2.2: Sistema de electrofiação utilizado com seringa na bomba



Figura 2.3: Orifício na caixa por onde passa a agulha da seringa

2.2 Composição das soluções

Para produzir as soluções usadas na electrofiação e no espalhamento de filmes, utilizou-se PVP (peso molecular wt. 10000) e PVP-I (adquiridos à *Sigma Aldrich*) e, como solvente, misturas de água destilada e etanol. As especificações dos polímeros utilizados podem ser observadas na tabela seguinte. Embora a informação do peso molecular do PVP-I não seja indicado pelo fornecedor, ele é muito baixo comparativamente ao do PVP, já que as soluções de PVP-I são muito pouco viscosas. Aliás, é esta a razão para a necessidade de incluir PVP na solução a electrofiar - aumentar a viscosidade da solução, tornando-a processável por este método.

	PVP	PVP-I
Nome	<i>Polyvinylpyrrolidone</i>	<i>Poly(vinylpyrrolidone)Iodine complex</i>
Número CAS ^a	9003-39-8	25655-41-8
Aparência	Pó Branco	Pó Castanho
Solubilidade (Turvação)	100mg/ml em água (Transparente)	100mg/ml em água (Castanho escuro)
Água	≤5.0%	
Perda em secagem	Não disponível	≤8.0%
Azoto	11.5 - 12.8%	9.5 - 11.5%
Iodo	0%	9.0 - 12.0%
Metais pesados	Não disponível	≤20 ppm
pH	3-7 (solução a 5%)	Não disponível

^ado inglês *Chemical Abstracts Service*

Foram utilizadas soluções com diferentes concentrações poliméricas e com diferentes proporções de água e etanol no solvente. As concentrações poliméricas serão indicadas como a percentagem mássica de polímero de cada solução, a % referida é em função da massa total de solução (equação 2.1). A constituição do solvente será indicada sob a forma de uma proporção H₂O:EtOH.

$$\%_{polímero} = \frac{m_{polímero}}{m_{total}} \times 100 \quad (2.1)$$

De agora em diante, as soluções usadas para electrofiação serão referidas pela letra **S** e as soluções utilizadas para filmes pela letra **F**, ambas acompanhadas por um número que representará a percentagem de PVP-I. A composição das soluções produzidas e respectivas denominações pode ser consultada na tabela 2.1.

Inicialmente, utilizaram-se para electrofiação soluções com 15% de PVP e 1% de PVP-I, mas com solventes com diferentes proporções H₂O:EtOH. Uma diminuição desta razão (aumento de etanol no solvente) tem como consequência o aumento da taxa de evaporação do solvente (esta depende também das condições ambientais) e uma diminuição da tensão

Tabela 2.1: Soluções produzidas durante o projecto

Denominação	PVP (%)	PVP-I (%)	H ₂ O:EtOH
	15	0	1:1
	15	1	0:1
	15	1	1:3
	15	1	1:1
S0	18	0	1:1
S1	18	1	1:1
S3	18	3	1:1
S5	18	5	1:1
F0	18	0	0:1
F5	7,2	2	0:1

superficial. As primeiras deposições tinham como solvente 100% EtOH, ou seja, o solvente evaporava completamente ao longo do voo. Com a alteração das condições atmosféricas (aumento de temperatura e diminuição de humidade), o uso desta proporção de solvente (0:1) revelou-se um obstáculo ao processo de electrofiação: com o aumento de temperatura, aumentou a taxa de evaporação do solvente, o que causou uma secagem do polímero logo na ponta da agulha, na gota. Aumentou-se então a proporção de H₂O:EtOH, de modo a diminuir a taxa de evaporação do solvente, para 1:3 e 1:1. As fibras mais uniformes, decorrentes de deposições mais estáveis, tiveram no solvente proporção 1:1. Quando as fibras não têm tempo para secar durante o voo em direcção ao alvo, projectam-se neste ainda com solvente (este efeito, que se mostra na figura 3.4 da secção 3.1, será discutido nessa secção). Com um solvente resultante de partes iguais de água e EtOH, este factor (secagem durante o voo) teve de ser mais considerado.

Para variar a viscosidade da solução, consideraram-se as soluções de 18% de PVP. A variação da quantidade de iodo nas fibras é introduzida pela variação da concentração de PVP-I na solução.

Durante o processo de electrofiação, o solvente evapora e a composição das fibras produzidas depende apenas da proporção entre as concentrações dos polímeros na solução precursora. Para, por espalhamento de uma solução, obter filmes finos e uniformes, a solução de que se parte não pode ser muito viscosa. Convém ainda usar-se um solvente volátil para que o filme não leve muito tempo a secar. Assim, as soluções F0 e F5 (ver tabela 2.1), utilizadas para os filmes, foram preparadas com proporções PVP:PVP-I de 1:0 e de 18:5, à semelhança das soluções S0 e S5 (S0 é significativamente mais viscosa que S5), utilizadas na produção de matrizes de nanofibras. Como solvente utilizou-se 100% de etanol.

Para se preparar um filme, verteu-se a solução precursora numa folha de acetato STAEDTLER Lumocolor Photocop film Kopierfolie (0.10 mm) (210 x 297 mm, A4) e deixou-se secar.

2.3 Propriedades físicas das soluções

Para determinar as características das soluções utilizadas, fizeram-se medições de viscosidade, de densidade, de tensão superficial e de condutividade.

2.3.1 Viscosidade

A viscosidade de uma solução é uma propriedade que reflecte o seu comportamento de escoamento. As curvas de fluxo (viscosidade vs. taxa de cisalhamento) das soluções S0-S5 foram obtidas num reómetro rotacional *Malvern Instruments* (modelo *Bohlin Gemini HR_{nano}*), com geometria de cone (40 mm e 2° de inclinação) e prato, a partir dos quais a viscosidade (entendida como o valor correspondente a uma taxa de cisalhamento nula) foi determinada. Para proceder à medição, a solução é espalhada sobre o prato e o cone é posto a rodar impondo à solução uma taxa de cisalhamento. Os vários pontos da curva de fluxo são obtidos pelo sensor de pressão do cone rotativo para diferentes taxas de cisalhamento aplicadas. Todas as medições de viscosidade foram efectuadas a 25°C.

2.3.2 Densidade

A densidade da solução é a razão entre uma determinada massa de solução, m_s , e o volume, v_s , que ela ocupa. As medições de densidade das soluções S0-S5 foram efectuadas a 25°C num reómetro *KSV INSTRUMENTS Ltd.*, modelo SIGMA 702.

Na medição, uma esfera, de massa (m_e) e volume (v_e) conhecidos, é suspensa num suporte do instrumento que identifica o seu peso. A esfera é depois introduzida na solução até ficar totalmente imersa. O instrumento indica então um valor de massa, $m_{indicada}$, que corresponde à diferença entre o peso e a impulsão (dividida pela aceleração da gravidade). A densidade é, assim, dada por 2.2:

$$\rho = \frac{m_e - m_{indicada}}{v_e} \quad (2.2)$$

Neste trabalho, $m_e=2,04$ g e $v_e=0,867$ ml.

2.3.3 Tensão superficial

A tensão superficial de um líquido tem origem na diferença entre as intensidades das forças a que as moléculas na superfície do líquido estão sujeitas, devido às interacções com as outras moléculas do líquido e com as moléculas do ar circundante. A resultante é uma força que aponta para o interior do líquido e que tende a diminuir a área da superfície exposta. Os valores da tensão superficial das soluções S0-S5 foram obtidos pelo software *KSV Contact Angle Measurement System*, através do método da gota suspensa (ver figura 2.4 (a)): da agulha, posta numa seringa com a solução, colocada na vertical, faz-se sair uma gota que

estabilize com volume mínimo de 5 μl . A gota é, então, fotografada (pela *Contact Angle and Surface Tension Meter CAM2008*); o software ajusta a linha que define a superfície da gota a uma função e, a partir do ajuste e da densidade da solução (que é introduzida pelo operador), determina a tensão superficial (a força por unidade de comprimento que conduz à formação da gota).

2.3.4 Condutividade

A condutividade de uma solução é uma propriedade eléctrica, inversa da resistividade, e que mede a capacidade da solução transportar cargas, quando sujeita a uma diferença de potencial. A medição da condutividade das soluções S0-S5 foi efectuada no aparelho HI4521 da *HANNA Instruments* (figura 2.4 (b)).

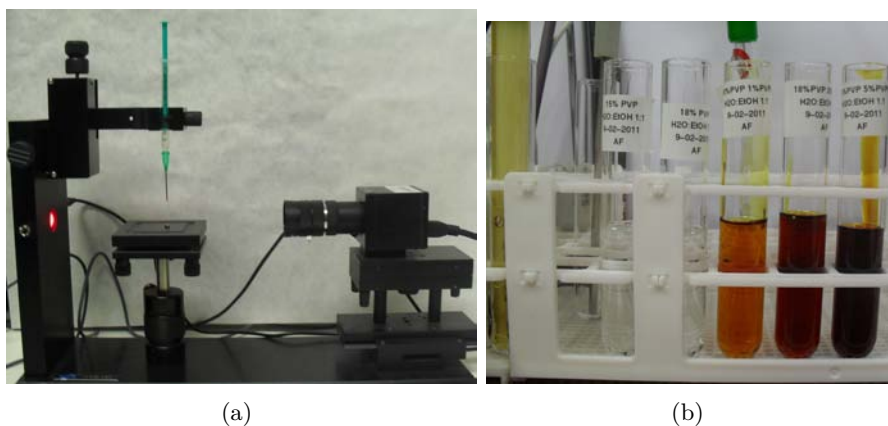


Figura 2.4: Aparelho de medição de tensão superficial (a) e medição de condutividade (b)

2.4 Métodos pós-produção

2.4.1 Reticulação por irradiação UV

O corpo humano é constituído, na sua maior parte, por água (entre 70 e 75% [38]). A pele é o maior órgão do corpo humano, responsável pela protecção externa e pela regulação da temperatura através da transpiração. Em condições normais, a sua superfície é relativamente húmida (devido à transpiração). No caso de lesão, uma grande quantidade de exsudado é produzido no leito da ferida. Assim, é necessário garantir que as matrizes de nanofibras de PVP e PVP-I (solúveis em água) não se dissolvam quando entram em contacto com a pele. Elas devem assegurar uma libertação sustentada do iodo que contêm, mantendo, assim, a anti-sepsia e impedindo infecções devidas a microorganismos. Segundo Ignatova M. (2007) [5], matrizes de nanofibras de PVP podem ser tornadas insolúveis por exposição a radiação UV (254nm) na presença de um fotoiniciador de reticulação.

A reticulação (*cross-linking* em inglês, que significa ligação cruzada) consiste no estabelecimento de ligações covalentes entre cadeias poliméricas. A absorção de radiação UV por um polímero tanto pode promover a formação destas ligações como resultar na clivagem das cadeias, o que provoca degradação [31]. Aumentando o nível de reticulação, aumenta a rigidez da estrutura, assim como o peso molecular das macromoléculas na nova estrutura que se torna menos solúvel. O grau de reticulação depende da dose de radiação absorvida.

Neste trabalho verificou-se que tanto os filmes como as matrizes de nanofibras de PVP com PVP-I, ao serem irradiadas com UV, vão-se tornando menos solúveis em água com o tempo de irradiação. A irradiação foi efectuada no aparelho *Ultraviolet Crosslinkers* (da marca *UVP - Ultra-Violet Products, Ltd.*), modelo CL-1000, que tem no seu interior 5 lâmpadas de 8 W que emitem radiação UV com comprimento de onda 254 nm.

Grau de inchamento e perda de massa

O grau de inchamento (ou *swelling degree*, em inglês) descreve a capacidade de absorção de água de um determinado material, quando imerso neste líquido ou quando sujeito ao seu vapor. O grau de inchamento de um material pode ser avaliado pela diferença relativa da massa, m_h , de uma amostra hidratada devido à absorção de água (a massa aumenta com o tempo de exposição ao líquido ou vapor até atingir este valor) e a massa inicial, m_s , da amostra seca [1, 5]:

$$\alpha\% = \frac{m_h - m_s}{m_s} \times 100 \quad (2.3)$$

Na determinação do grau de inchamento, procedeu-se da seguinte forma para avaliar a massa da amostra hidratada: deixou-se a amostra imersa em água por um tempo definido, durante o qual a absorção máxima é atingida; a amostra inchada foi, depois, retirada da água e o excesso de água na sua superfície foi cuidadosamente removido com um papel absorvente, determinando-se de seguida a massa m_h .

A reticulação de uma amostra afecta o seu grau de inchamento, na medida em que o número de ligações estabelecidas durante a reticulação diminui a disponibilidade de pontos de interacção com a água, o que faz diminuir a capacidade de absorção e o grau de inchamento. Assim, o grau de inchamento varia inversamente com o grau de reticulação.

A variação das dimensões da amostra durante o inchamento é um aspecto importante a ter em conta para a sua aplicação como cobertura de feridas. Se, por um lado, a capacidade de absorção do exsudado por parte da cobertura desempenha um papel relevante, esta capacidade da cobertura não deve implicar alteração significativa das dimensões superficiais. Esta alteração foi também avaliada aquando dos ensaios de inchamento.

A estabilidade de uma amostra em água é determinada pelo seu grau de reticulação. Dependendo deste, a amostra pode perder mais ou menos massa por dissolução durante a imersão. Esta perda de massa dá também uma indicação do grau de reticulação. A perda de massa foi calculada como a diferença entre a massa inicial da amostra seca e a massa, $m_{s'}$,

da amostra depois de a água absorvida durante o inchamento ter evaporado completamente (a evaporação é considerada completa quando a massa deixa de diminuir com o tempo):

$$\Delta m\% = (m_s - m_{s'}) \times 100 \quad (2.4)$$

Espectrofotometria de UV-visível

A libertação de iodo das matrizes de nanofibras (electrofiadas a partir de soluções de PVP com PVP-I) para água destilada foi monitorizada com base na análise de espectros de UV-visível. Nestes espectros (gráficos da absorvância em função do comprimento de onda da radiação absorvida¹) surgem picos característicos das várias espécies de iodo libertadas para a água onde a matriz foi colocada.

Os espectros foram obtidos no espectrofotómetro PERKIN ELMER LAMBDA 35 - *UV/Vis Spectrophotometer* da figura 2.5.



Figura 2.5: *PERKIN ELMER LAMBDA 35 - UV/Vis Spectrophotometer* (Departamento de Química da FCT/UNL)

Foram também obtidos espectros de soluções aquosas de PVP-I com diferentes concentrações para localizar e avaliar a variação da absorvância com a concentração de cada espécie de iodo². Esta avaliação permitiu estimar a dimensão das amostras das matrizes a utilizar nos testes de libertação de iodo.

Uma das metodologias que pode ser seguida para a realização de um teste de libertação é retirar, em determinados instantes, amostras do meio para o qual a libertação ocorreu. Cada vez que é retirada uma amostra, a quantidade total do meio é reposta. As amostras são analisadas espectroscopicamente e a quantidade de substância libertada avaliada. O espectro

¹a absorvância descreve a capacidade intrínseca de um material absorver determinada radiação electromagnética numa frequência (ou comprimento de onda) específica

²como há sobreposição dos picos das várias espécies de iodo e sobreposição destes com o pico do PVP, não é possível estabelecer uma relação linear (usando a lei de *Beer-Lambert*) entre a absorvância e a concentração das várias espécies de iodo

cumulativo é construído a partir da informação recolhida. Este procedimento não é adequado para analisar o iodo libertado das matrizes já que, durante os procedimentos, este escapa facilmente do meio (água) para o ambiente. Convém, assim, que o processo envolva a menor exposição possível do meio de libertação ao ambiente e, por isso, optou-se por realizar os testes nas células fechadas utilizadas no espectrofotómetro³, adquirindo os espectros em tempo real, isto é, enquanto a libertação ocorre. À medida que o iodo se liberta da matriz, difunde-se na água, onde surgem gradientes de concentração que prejudicam a qualidade dos espectros. Para uniformizar o meio a analisar e impedir que a matriz interferisse com o trajecto da luz na célula, utilizou-se o seguinte arranjo (ver figura 2.6): um agitador magnético (HELLMA CUV-O-STIR *Model 333*), colocado sob a base da célula, põe em agitação suave um pequeno magneto que está dentro da célula; ainda no interior, mas no topo da célula, uma rede de *teflon* suporta a matriz de nanofibras. A quantidade de água usada na célula foi estabelecida e vários espectros foram obtidos ao longo do tempo. Na figura 2.7 pode ser observada a montagem, descrita anteriormente, colocada no espectrofotómetro utilizado.

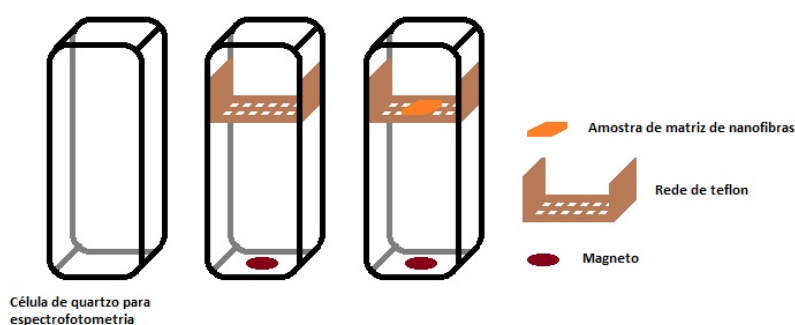


Figura 2.6: Sistema de montagem para espectrofotometria de libertação

³as células utilizadas para espectrofotometrias são células com 2 faces de quartzo, 10 mm de caminho óptico, capacidade de 3,5 ml e com tampa de *teflon*



Figura 2.7: Montagem para obtenção de espectros de libertação de iodo da matriz de nanofibras electrofiadas ao longo do tempo

2.5 Testes microbiológicos

Os meios de cultura (“conjunto de substâncias utilizadas como nutrientes para o crescimento e a multiplicação de microorganismos” [36]) preparados e a sua constituição estão indicados na tabela 2.2 (para além dos compostos indicados, foi usada água bidestilada). Após a sua preparação, os meios foram esterilizados em autoclave a 120°C e a 1 atm durante 20 minutos. Os meios LB (do inglês, *Luria-Bertani Broth*) e YM (do inglês, *Yeast extract-Malt*) são meios líquidos, enquanto que os meios LA (do inglês, *Luria-Bertani Agar*) e YMA (do inglês, *Yeast extract-Malt extract Agar*) são obtidos dos correspondentes meios líquidos aos quais se adiciona agar (aproximadamente 2%). Após preparação e auto-clavagem, o meio é vertido numa placa de *Petri*, solidificando à temperatura ambiente.

Para preparar as placas de crescimento, foram vertidos cerca de 20 ml do meio de agar autoclavado, LA ou YMA consoante a estirpe em causa. A placa foi, depois, colocada na estufa (figura 2.9 (b)) a 37°C para que o meio solidificasse e de modo a que, após incubação a 37°C durante a noite, se observasse que os meios de cultura nas placas estavam estéreis.

As estirpes utilizadas neste trabalho estavam conservadas como culturas puras a -80°C em meio líquido BHI (do inglês, *Brain Heart Infusion*) com 15% glicerol (v/v).

Para os ensaios microbiológicos, para obtenção de colónias isoladas, foram preparadas culturas em meio sólido, transferindo uma alíquota ou inóculo (cerca de 10 μ l) para a placa de *Petri* com meio e agar. O inóculo foi, então, espalhado no meio de cultura, na placa de *Petri*, com ansa de repicagem e as placas foram incubadas em estufa a 37°C, durante a noite (18-24h).

Para obtenção de culturas em meio líquido, é retirada uma colónia isolada de cada estirpe, com ansa de repicagem, que é colocada em balões com determinado volume (cerca de 50 ml) de meio líquido. Os balões são depois incubados num agitador (marca *Gallenkamp* (figura

Tabela 2.2: Constituição dos meios de cultura

Meio	Composição	Quantidade (em % do total de meio)
YM: Meio de Malte e Peptona	Extracto de Malte	0,3
	Extracto de Levedura	0,3
	Peptona	0,5
	Glucose	1,0
YMA: Meio de Malte e Peptona em Agar	Extracto de Malte	0,3
	Extracto de Levedura	0,3
	Peptona	0,5
	Glucose	1,0
	Agar	2,0
LB: Meio de Levedura	Tritptona	1,0
	Extracto de Levedura	0,5
	Cloreto de sódio	0,5
LA: Meio de Levedura em Agar	Tritptona	1,0
	Extracto de Levedura	0,5
	Cloreto de sódio	0,5
	Agar	2,0

Tabela 2.3: *Estirpes utilizadas nos testes microbiológicos - pertencem às colecções de culturas internacionais: ATCC (American Type Culture Collection) e PYCC (Portuguese Yeast Culture Collection)*

<i>S. aureus</i>	ATCC 25923
<i>S. epidermidis</i>	ATCC 14990
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 10145
<i>C. albicans</i>	PYCC 3436T

2.9 (a))) a 37°C durante a noite (18-24h).

Após o crescimento durante a noite, antes de começar qualquer teste microbiológico, é necessário saber a densidade óptica do inóculo - efectua-se a leitura de uma porção do líquido no espectrofotómetro a 600 nm (2.9 (c))- , e, eventualmente, proceder às diluições necessárias para usar a concentração celular desejada.

Neste trabalho, os plaqueamentos (propagação em placas de *Petri* de células provenientes de uma porção de uma cultura em meio líquido) foram efectuados espalhando-se um volume de 100 µl de uma cultura líquida (nas placas de *Petri*) com esferas de vidro ($\varnothing = 3$ mm). Após o espalhamento, inverteu-se a placa, de modo a que as esferas ficassem na sua tampa, para as retirar, de seguida, tirando a tampa. A placa foi, então, novamente tapada, colocando-se na

estufa a 37 °C durante a noite, após o que se pôde fazer a contagem de colónias. Os tempos de incubação para a contagem de colónia foram de 24 horas (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*) ou 48 horas *C. albicans*.

A número de colónias numa placa de *Petri* (de 90mm) é considerada contável quando é possível, a olho nu, definir os bordos das colónias e a contagem se situa entre 30 e 300 unidades. Classifica-se de incontável quando há tantas colónias (superior a 300 unidades) que é impossível contá-las e de confluyente quando os bordos das colónias não estão bem definidos. O número N de colónias contadas, ou número de unidades formadoras de colónias (UFC), é utilizado para expressar a densidade de células na cultura do meio líquido plaqueada em UFC/ml:

$$UFC/ml = N \times \frac{1}{I} \quad (2.5)$$

onde I é a quantidade (em ml) de cultura colocada na placa. Neste trabalho usou-se I = 0,1 ml.

Frequentemente, o número de colónias formadas no plaqueamento de uma cultura líquida (por exemplo, no plaqueamento do inóculo) é incontável. Nesse caso, é necessário proceder-se à diluição da cultura original, que é definida pela expressão $D = \frac{\text{volume diluído}}{\text{volume total da diluição}}$.

Nestes casos, após contagem do número de colónias, N, da placa com uma cultura com diluição, D, é necessário utilizar a expressão 2.6 para se conhecer a densidade original de células nessa placa (antes da diluição). No caso de serem efectuadas várias diluições sucessivas, cada uma delas caracterizada por um valor D_i , D é dado pelo produto dos vários D_i s.

$$UFC/ml = N \times \frac{1}{D} \times \frac{1}{I} \quad (2.6)$$

Na figura 2.8, está esquematizado o processo de diluições sucessivas (e respectivos plaqueamentos). Nos tubos amarelos está indicado o volume de meio líquido (no esquema está indicado o meio de crescimento LB mas este esquema é válido para qualquer meio de crescimento) necessário para ir procedendo às diluições que se queiram efectuar. Sob as setas verdes está indicado o volume de cultura (origem da seta) a juntar ao meio de crescimento (final da seta). O valor de D, valor ao fim das diluições sucessivas, está indicado nos tubos laranja. O volume utilizado nos plaqueamentos, ao longo dos testes microbiológicos, está indicado ao lado das setas azuis. A seta roxa indica que se pode fazer uma diluição de $D = 10^{-4}$ a partir de uma diluição $D = 10^{-2}$ desde que se adicione 90 μ l de meio de crescimento ao tubo amarelo (previamente com 900 μ l) e 10 μ l da cultura com diluição $D = 10^{-2}$. Neste trabalho, as diluições foram efectuadas em tubos microtubos de 1,5 ml. Para agitar os tubos utilizou-se o agitador da figura 2.9 (d).

Antes de proceder a qualquer tipo de teste microbiológico, começou por se determinar a curva de crescimento (“representação gráfica do crescimento populacional das células em

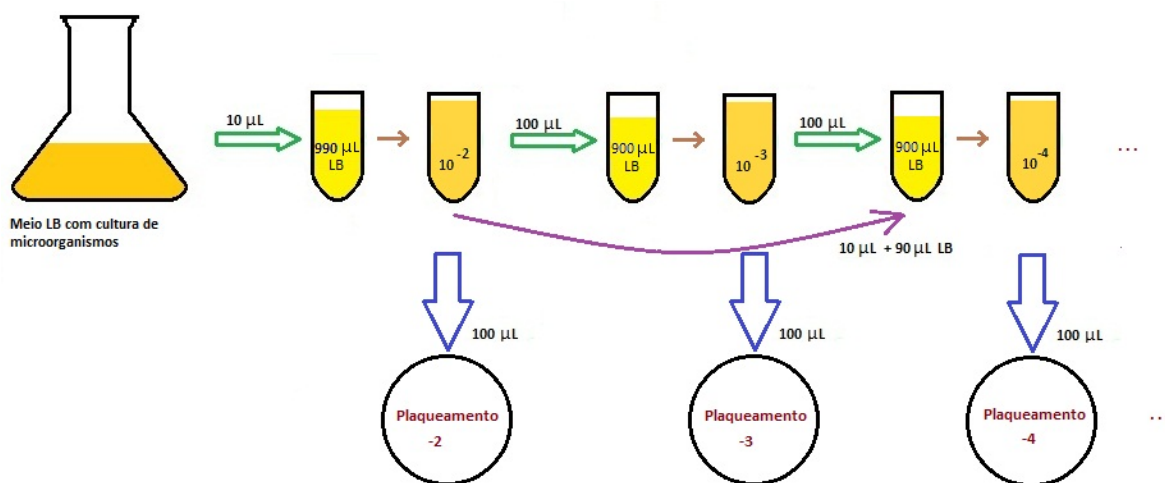


Figura 2.8: Esquema das diluições de culturas bacterianas ou fúngicas e plaqueamento. O significado da figura está explícito no texto.

meio de cultura” [36]) e de densidade óptica a 600 nm, DO_{600} , das estirpes utilizadas. Para tal, depois do crescimento da estirpe durante a noite, estipula-se um valor inicial de DO_{600} e dilui-se a cultura para um balão com o meio respectivo, de modo a obter esse valor. Depois de diluída, plaqueia-se, como explicado anteriormente. A densidade de células, encontrada através da contagem efectuada na placa, fica então associada ao valor de DO_{600} medido e ao tempo 0. Ao longo do tempo vai-se procedendo a leituras de DO_{600} e respectivo plaqueamento. É, então, obtida uma curva de evolução no tempo da densidade de células na cultura líquida do balão (curva de crescimento exponencial) e estabelecida a sua relação com DO_{600} - padronização óptica da curva de crescimento.

Em determinadas alturas do trabalho, foi necessário obter um determinado volume de cultura líquida com determinada densidade de células para a qual se conhecia o valor de DO_{600} , tendo em conta a padronização da curva de crescimento: $DO_{600} = D_f$. Dispunha-se, para tal, de uma cultura com um valor de $DO_{600} = D_i$. Para estimar o volume, v_i , desta cultura, que permite obter um volume v_f da cultura pretendida, usou-se a relação 2.7.

$$D_i \times v_i = D_f \times v_f \quad (2.7)$$

Todos os procedimentos foram efectuados em bancadas anti-sépticas (desinfecção com etanol), à chama, e com material esterilizado previamente. Para esterilizar as soluções, utilizaram-se filtros estéreis da *Orange Scientific* com poros de 0,45 μm .

2.5.1 Concentração mínima inibidora

A concentração mínima inibidora (em inglês, *minimum inhibitory concentration* ou MIC) é, como o nome indica, a concentração mínima de um agente antimicrobiano necessária para

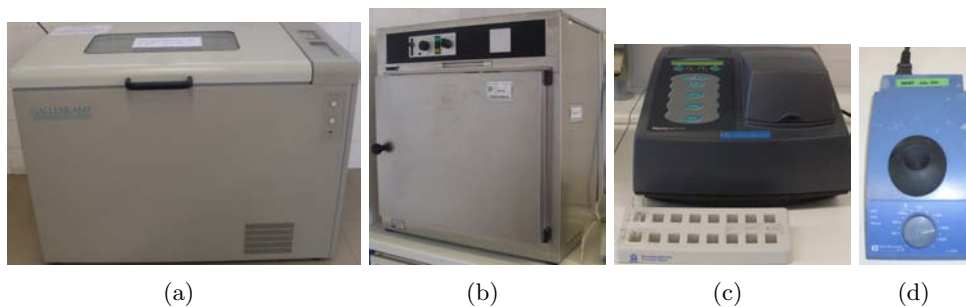


Figura 2.9: Aparelhos utilizados nos testes microbiológicos: Gallenkamp (agitador com controlo de temperatura e rotação) (a), estufa (b), espectrofotómetro a 600 nm (c) e agitador (d)

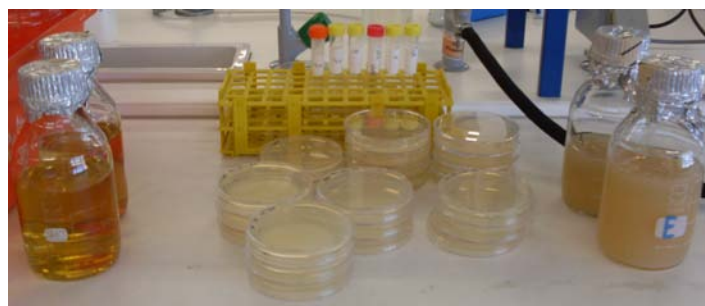


Figura 2.10: Algum material utilizado nos testes microbiológicos

inibir a proliferação de microorganismos. Para a determinação de valores de CMI são usadas diferentes concentrações do antimicrobiano, geralmente obtidas em diluições sucessivas do mesmo, e uma cultura de microorganismos com uma determinada densidade (a concentração é fixa e superior a 10^5 UFC/ml porque se considera que, em condições normais, os microorganismos podem colonizar o hospedeiro, mas é a partir do valor referido que se considera a possível ocorrência de uma infecção). A CMI é determinada com base na comparação entre a turvação das culturas na presença de várias diluições do agente antimicrobiano: se for observada turvação, existe crescimento dos microorganismos mas, se, pelo contrário, existe limpidez, os microorganismos não proliferaram porque estão inactivos ou porque ocorreu, mesmo, morte celular. Existe então uma concentração a partir da qual não existe crescimento de microorganismos e a concentração seguinte (mais elevada) de agente antimicrobiano é a considerada como CMI.

Neste trabalho, o iodo activo está complexado no PVP-I, que é o produto utilizado com propriedades antimicrobianas. Assim, procedeu-se à determinação da CMI do PVP-I em solução aquosa. Os testes foram feitos em triplicado.

2.5.2 Teste Kirby-Bauer ou de difusão em agar

O método Kirby-Bauer, ou de difusão em agar, consiste na colocação de discos, com concentrações conhecidas de determinado agente antimicrobiano, na superfície de uma placa

contendo um meio sólido apropriado e previamente inoculado com o microorganismo cuja susceptibilidade se pretende testar. O agente antimicrobiano difunde-se a partir do disco para o meio circundante, formando um gradiente de concentração que decresce desde o perímetro do disco até distâncias mais elevadas. Os microorganismos multiplicam-se exponencialmente em toda a superfície da placa, à excepção das zonas à volta do disco impregnado de antimicrobiano, no caso de serem sensíveis ao mesmo. As zonas em que o seu crescimento é inibido ou a sua morte é provocada pela concentração do antimicrobiano, tornam-se visíveis através de uma zona clara que rodeia o disco e a que se dá o nome de halo ou zona de inibição. A medição do diâmetro da zona de inibição é geralmente feita em *mm*.

Para estes testes, colocaram-se discos do substracto na placa de agar, onde se efectuou uma sementeira de cultura com determinada densidade, por forma a que as UFC/ml, após incubação, originem uma cultura confluenta. No caso do agente libertado ser eficaz na inibição do crescimento, surgem, em torno do respectivo substracto, zonas onde não houve crescimento da cultura.

Neste trabalho, após a preparação das placas com agar, espalharam-se sobre a mesma 100 μ l de cultura com determinada DO₆₀₀ (número de UFC conhecido). O espalhamento foi efectuado com esferas de vidro, como referido anteriormente. Em diversos pontos das placas de *Petri*, foram colocados discos de 8 mm de: papel de filtro embebido em soluções aquosas de PVP-I, matrizes de nanofibras de PVP com PVP-I e matrizes de PVP. As placas foram colocadas em estufa a 37°C durante o tempo de incubação das culturas, ao fim do qual foi medida a zona de inibição em *mm*(incluindo o disco).

A esterilização dos discos usados nas culturas foi acautelada. As soluções usadas (ver tabela 2.4) para embeber os discos de papel de filtro (estéreis) foram filtradas em filtros estéreis da *Orange Scientific* com poros de 0,45 μ m.

A esterilização das matrizes de nanofibras é assegurada aquando da sua reticulação por exposição a radiação UV (após este processo as matrizes são mantidas em ambiente estéril até à realização do teste).

Soluções semelhantes à S5 foram sujeitas ao teste de difusão (não se utilizou a solução S5 devido à sua elevada viscosidade e à provável dificuldade em esterilizar a mesma através de filtro), tendo sido determinado que se testariam soluções com a mesma percentagem de PVP-I da solução S5 e variações desta (ver tabela 2.4). Deste modo, foi possível observar o efeito da variação da concentração de PVP-I. Também foi usada uma solução com 1% PVP (T10) apenas para verificar a ausência de acção biocida. O solvente utilizado foi 100% água destilada.

2.5.3 Testes de libertação de iodo em cultura

A acção biocida foi ainda avaliada em meio líquido e ao longo do tempo. As matrizes de nanofibras testadas foram produzidas a partir das soluções S5 e S0 e irradiadas com UV

Tabela 2.4: Soluções produzidas para testes Kirby-Bauer

Denominação	PVP-I (%)
T01	1
T02	2
T03	3
T04	4
T05	5

durante 4 horas. Os testes foram efectuados contra a cultura de *S. aureus*. A quantidade de matriz de S5 a ser utilizada para este teste foi determinada considerando o valor de CMI, a quantidade de meio líquido a utilizar e os resultados da espectrofotometria de libertação de iodo.

O procedimento seguido foi o seguinte: a matriz foi colocada num balão com 10 ml de LB com 10 μ l de 10^8 UFC/ml de cultura (resultando em 10^5 UFC/ml de cultura no balão); o balão foi colocado na estufa a 37°C; após determinados tempos de interacção entre a matriz e a cultura (0 min, 30 min, 60 min, 90 min, 24 h) foi efectuado o plaqueamento da suspensão, procedendo-se como habitualmente para avaliar o número de colónias ou UFC/ml.

Capítulo 3

Apresentação e discussão de Resultados

3.1 Influência dos parâmetros de produção nas deposições

Inicialmente, foram feitas algumas deposições de modo a verificar a influência da variação dos parâmetros de produção nas características da deposição.

Na tabela 3.1, estão indicadas as condições de produção de algumas das deposições efectuadas a partir de uma solução de 15% PVP e 1% PVP-I em 100% de EtOH, cujas imagens podem ser observadas nas figuras 3.1.

Tabela 3.1: *Parâmetros de processo e ambientais relativos às imagens SEM1 a SEM3*

Deposição	Parâmetros de processo			Parâmetros ambientais	
	d (cm)	V (kV)	f (mL/h)	Temperatura (°C)	Humidade Relativa (%)
SEM1	17	6.5	0.2	17.9	54
SEM2	17	15.0	0.2	19.6	33
SEM3	17	6.5	0.4	19.9	51

Nas imagens de SEM (figura 3.1), é possível observar que o aumento de tensão (com distância e fluxo fixos) reduz o diâmetro das fibras - comparação entre SEM1 e SEM2 - e que o aumento do fluxo (com distância e tensão aplicada fixas) aumenta o diâmetro das fibras - comparação entre SEM1 e SEM3. Observando a imagem da SEM2, verifica-se que há zonas em que as fibras se fundem, significando que o solvente não evaporou completamente durante o tempo de voo e que há fibras de polímero mais finas do que as restantes fibras, resultantes da tensão aplicada ser demasiado elevada, o que provoca um aumento da carga e correspondente aumento de repulsão electrostática, com a formação de jactos múltiplos.

A imagem 3.2 da deposição SEM2 com 2h de irradiação UV (SEM2UV) mostra que não há alteração física da matriz durante a reticulação.

As deposições correspondentes à tabela 3.2 foram efectuadas a partir de deposições de uma solução de 15% PVP e 1% PVP-I numa mistura de 50% de água e 50% de EtOH. Nas imagens de MO correspondentes (figura 3.3) também é possível observar a influência da variação dos parâmetros do processo na deposição de nanofibras: com o aumento da tensão (com distância e fluxo fixos) - comparação entre MO5 e MO7 - e com o aumento da distância (com tensão aplicada e fluxo fixos) - comparação entre MO5 e MO8 -, observa-se uma diminuição do diâmetro das fibras; com um grande aumento de tensão aplicada (com distância e fluxo fixos) - comparação entre MO5 e MO9 -, devido à diminuição do tempo de voo, o solvente não evapora durante o voo e as fibras fundem-se na deposição.

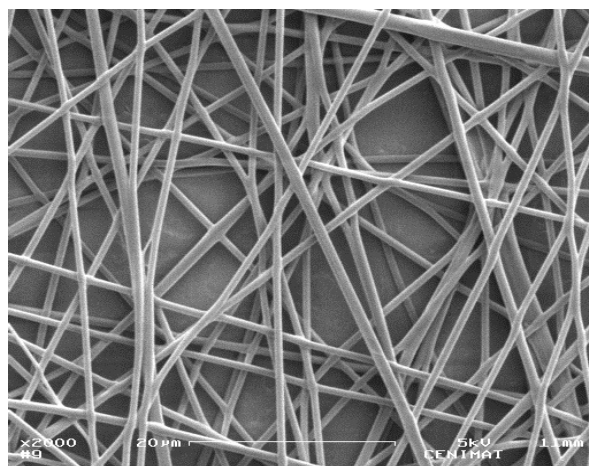
Tabela 3.2: *Parâmetros de processo e ambientais relativos às imagens MO5 a MO10*

Deposição	Parâmetros de processo			Parâmetros ambientais	
	d (cm)	V (kV)	f (mL/h)	Temperatura (°C)	Humidade Relativa (%)
MO5	17	9.0	0.2	24.6	37
MO6	17	10.0	0.2	25.0	30
MO7	17	12.0	0.2	25.0	30
MO8	21	9.0	0.2	24.6	37
MO9	17	14.0	0.2	24.7	36
MO10	17	14.0	0.3	25.0	30

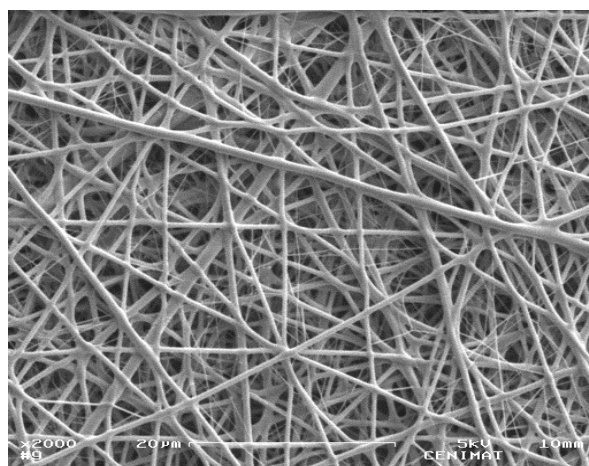
Na figura 3.4, é possível observar uma deposição, efectuada (fluxo a 0,1 ml/h) a partir de uma solução de 18% PVP e 1% PVP-I numa mistura de 50% de água e 50% de EtOH, em que o solvente não evaporou durante o tempo de voo. Tal deveu-se ao facto da distância entre a agulha e o prato colector ser muito pequena (8 cm) e a tensão aplicada muito elevada (13 kV), o que está na origem de um tempo de voo muito reduzido.

Para assegurar uma rápida evaporação do solvente, começou por se usar EtOH a 100%. Dado que a certa altura se verificou que foi necessário aumentar a concentração de PVP-I nas nanofibras electrofiadas, alterou-se a concentração de 1% PVP-I para 5%. Como, com 15% PVP e 5% PVP-I havia sempre gota na ponta da agulha durante as deposições, aumentou-se a concentração de PVP (para 18%) para aumentar a viscosidade da solução. Com o aumento da viscosidade da solução e da tensão aplicada, deixou de haver gota na ponta da agulha e passou a ser possível electrofiar a solução.

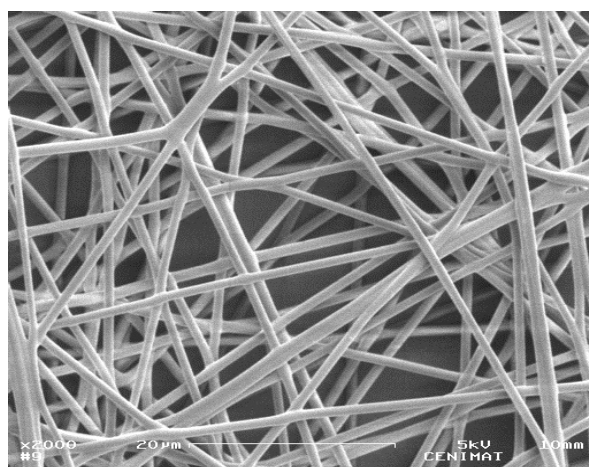
A partir deste momento, e uma vez que as condições atmosféricas se tinham alterado significativamente (subida de temperatura e diminuição de humidade relativa), deixou de ser possível electrofiar soluções com solvente 100% EtOH. Assim, passou a usar-se um solvente constituído por iguais partes de água destilada e etanol.



(a)



(b)



(c)

Figura 3.1: Imagens de SEM de deposições de nanofibras (a) SEM1, (b) SEM2 e (c) SEM3, de soluções 15% PVP e 1% PVP-I com solvente 100% EtOH

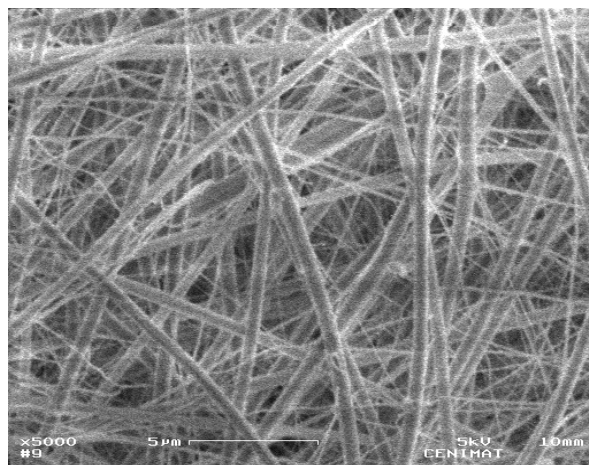


Figura 3.2: Imagem de SEM da deposição SEM2 após 2h de irradiação UV

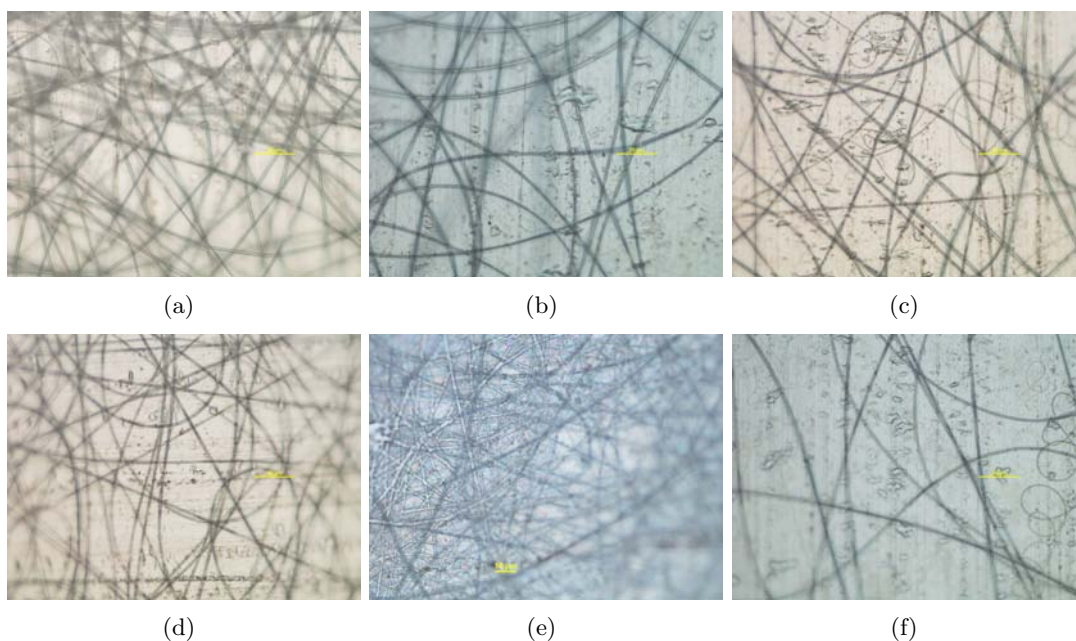


Figura 3.3: Imagens de MO (ampliação 50x) de deposições de nanofibras (a) MO5, (b) MO6, (c) MO7, (d) MO8, (e) MO9 e (f) MO10 de soluções 15% PVP e 1% PVP-I com solvente 50% água destilada e 50% EtOH

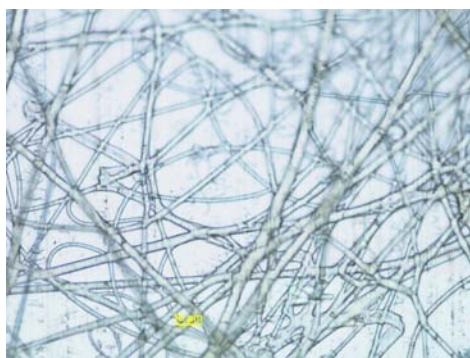


Figura 3.4: *Imagem de MO (ampliação $\times 50$) de uma deposição sem evaporação completa do solvente*

3.2 Propriedades das soluções

Para as soluções S0, S1, S3, S5 (ver tabela 2.1) e para a solução de PVP a 15% (solvente água e etanol a 1:1), foram efectuadas medições de condutividade, viscosidade, densidade e tensão superficial. As soluções foram produzidas no próprio dia das medições. No caso da condutividade, e para as soluções S0-S5, foram ainda feitas medições seis dias depois para avaliação de possíveis variações da condutividade com o tempo. Os resultados podem ser observados na tabela 3.7.



Figura 3.5: Soluções utilizadas ao longo do trabalho: 15% PVP, S0, S1, S3 e S5

3.2.1 Viscosidade

Os resultados da medição da viscosidade das soluções estão indicados no gráfico da figura 3.6.

Os valores registados na tabela 3.3 correspondem à viscosidade para uma taxa de corte nula e foram obtidos fazendo a média dos valores da viscosidade obtida para as taxas mais baixas de corte (zona de patamar no gráfico).

Tabela 3.3: Resultados obtidos nas medições de viscosidade

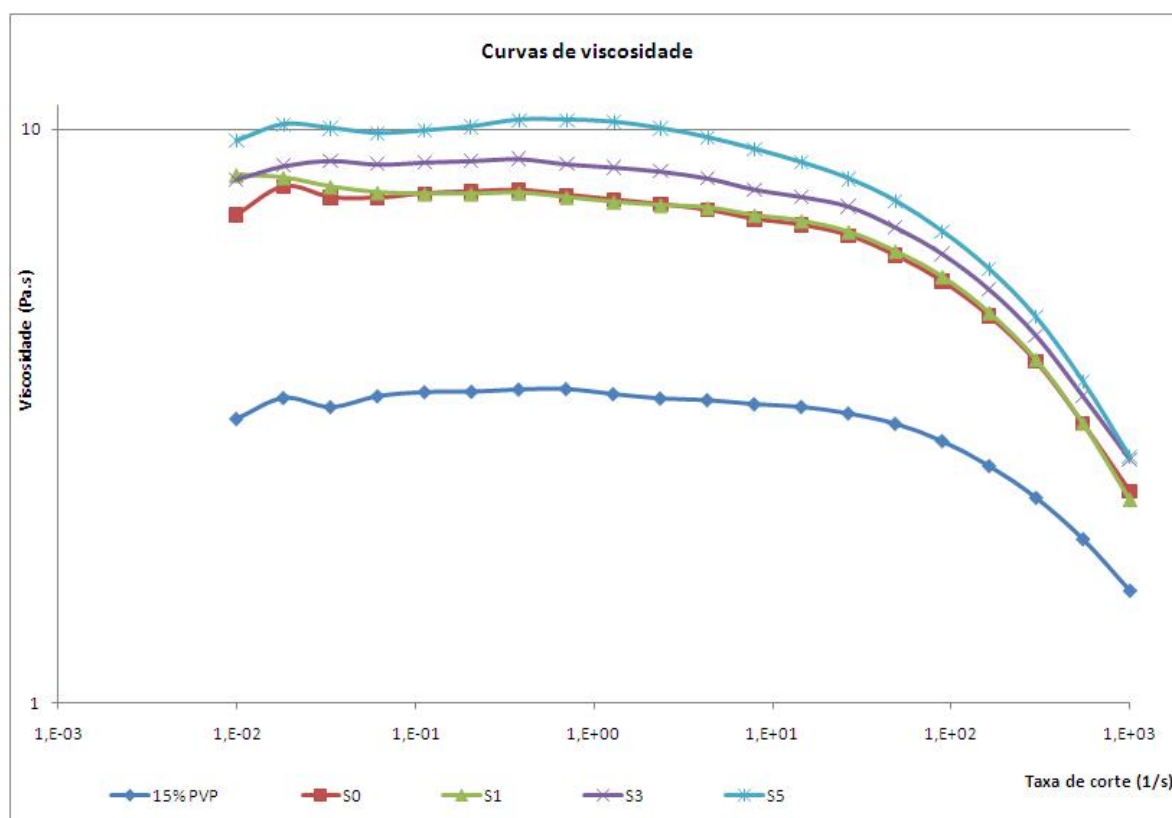
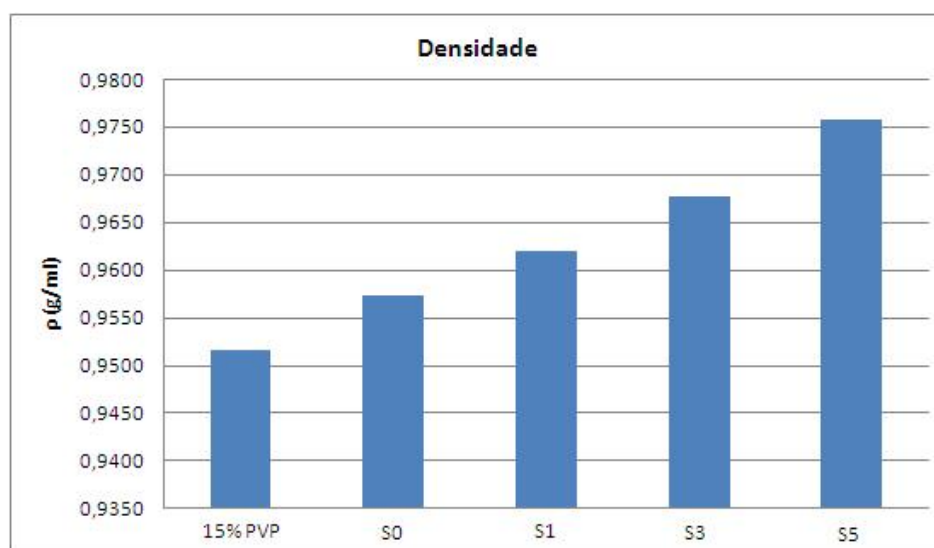
	15% PVP	S0	S1	S3	S5
Viscosidade (Pa.s)	3,416	7,640	7,825	8,667	10,077

3.2.2 Densidade

As densidades das soluções foram obtidas usando a expressão 2.2 a partir das massas indicadas pelo aparelho. Ambos os valores estão registados na tabela 3.4. Na figura 3.7 apresenta-se uma representação gráfica destes valores.

3.2.3 Tensão superficial

Os resultados finais de tensão superficial são os valores indicados pelo software ($\gamma_{indicada}$), no qual se introduz o valor da densidade previamente medida. Na tabela 3.5, estão registados

Figura 3.6: *Curvas de viscosidade*Figura 3.7: *Representação gráfica dos resultados de densidade*

o volume da gota usada e as tensões superficiais. Na figura 3.8 apresenta-se uma representação gráfica desta última quantidade.

Tabela 3.4: Resultados obtidos nas medições de densidade

	15%PVP	S0	S1	S3	S5
$m_{indicada}$	1,215	1,210	1,206	1,201	1,194
ρ (g/ml)	0,9516	0,9573	0,9619	0,9677	0,9758

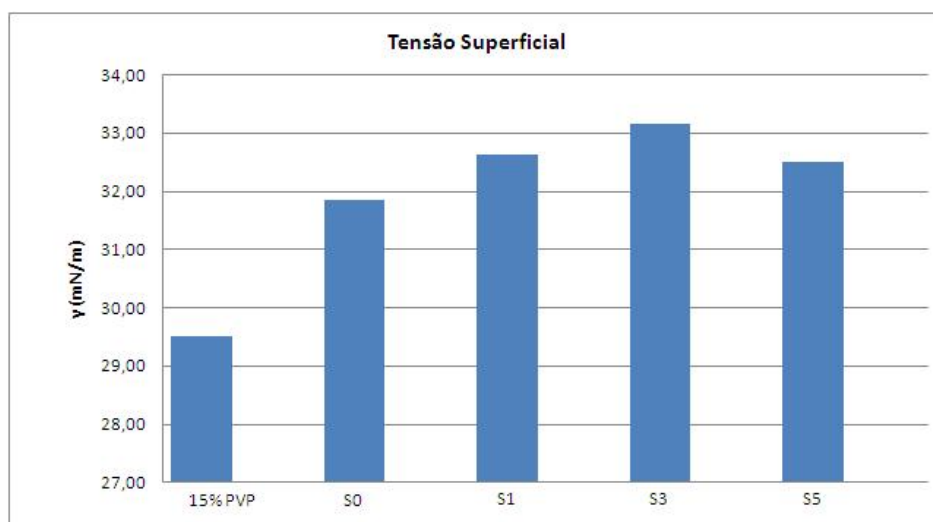


Figura 3.8: Representação gráfica dos resultados de tensão superficial

Tabela 3.5: Resultados obtidos nas medições de tensão superficial

	15%PVP	S0	S1	S3	S5
$\gamma_{indicada}$ (mN/m)	29,52	31,84	32,64	33,15	32,50
V_{gota} (μ l)	9,18	6,10	7,57	7,26	7,07

3.2.4 Condutividade

A condutividade das soluções é indicada directamente pelo aparelho de medida. Os resultados encontrados estão registados na tabela 3.6, tal como a respectiva representação gráfica, que se pode observar na figura 3.9.

A condutividade, medida no dia em que se preparou, da solução de 15% PVP, é de 6,720 μ S/cm.

Tabela 3.6: Resultados obtidos nas medições de condutividade

	S0	S1	S3	S5
σ_{0dias} (μ S/cm)	3,612	146,6	406,5	646,6
σ_{6dias} (μ S/cm)	4,050	110,1	354,3	547,7

Os resultados da condutividade medida no dia 0 e no dia 6, a contar da preparação,

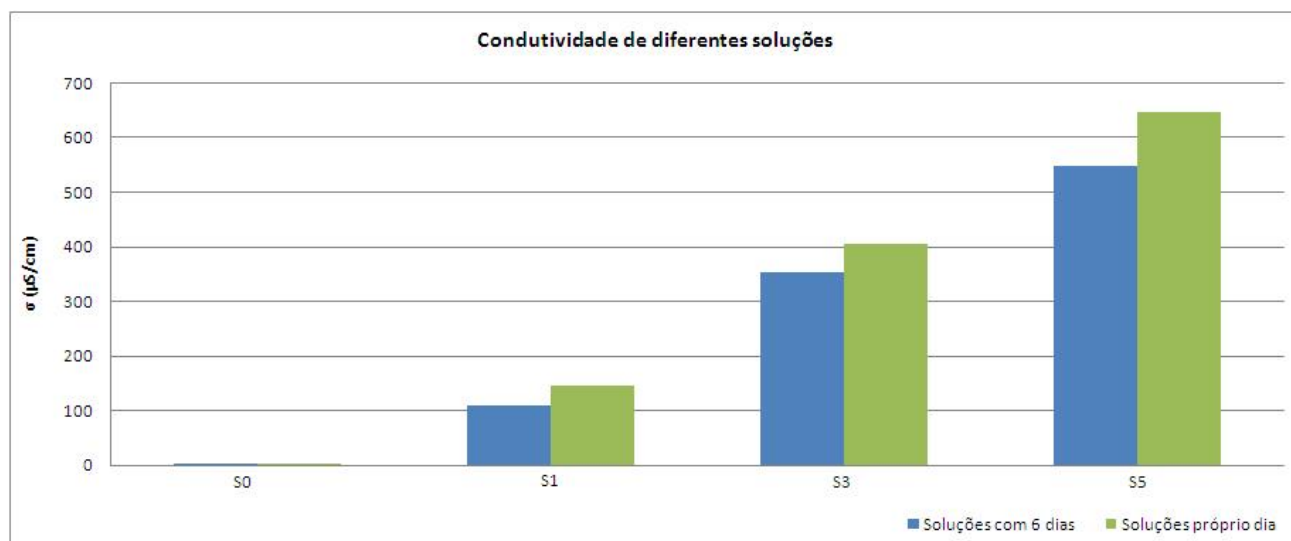


Figura 3.9: Resultados das medições de condutividade

revelam que:

- em ambos os dias, a condutividade da solução S0 é muito mais baixa que a das restantes, para as quais a condutividade aumenta com a quantidade de iodo;
- a variação da condutividade da solução S0 pode ser atribuída a flutuações que se observam mesmo quando se repete a medição de uma mesma grandeza;
- as soluções S1, S3 e S5 revelam uma diminuição considerável da condutividade, o que se pode atribuir à libertação de iodo; de facto, a coloração destas soluções diminui com o tempo decorrido após a produção.

Na tabela 3.7 sumarizam-se os valores das propriedades medidas para as soluções após a sua produção.

Tabela 3.7: Propriedades físicas das soluções S0, S1, S3, S5 e 15% PVP no próprio dia de produção

Soluções	Viscosidade Pa.s	Densidade g/ml	Tensão Superficial mN/m	Condutividade μS/cm
15% PVP	3,416	0,9516	29,49	6,720
S0	7,640	0,9573	31,61	3,612
S1	7,825	0,9619	33,46	146,6
S3	8,667	0,9677	33,08	406,5
S5	10,077	0,9758	32,45	646,6

Conclui-se assim que:

- a viscosidade aumenta tanto com a concentração de PVP como com a de PVP-I;
- as diferenças entre as densidades das soluções são mínimas;
- a tensão superficial aumenta ligeiramente com a concentração de PVP. A incorporação de PVP-I revela a mesma tendência, mas um aumento da concentração de PVP-I não tem nenhuma influência significativa;
- o aumento da concentração de PVP provoca a diminuição da condutividade (o PVP é não condutor), que aumenta (cerca de $50\times$) com apenas a incorporação de 1% de PVP-I, para, depois, revelar um aumento linear com o aumento da concentração deste polímero.

À medida que se adiciona PVP-I a uma mesma solução já com PVP, esta vai ficar mais viscosa e, principalmente, mais condutora. As principais dificuldades encontradas na fiação das soluções com PVP-I, em particular as de maior concentração, podem ser atribuídas a esta grande condutividade. De facto, havia a tendência para se formar uma pequena gota na ponta da agulha. Ao aumentar o potencial para conseguir uma maior extracção por parte do campo eléctrico, rapidamente se formavam jactos múltiplos e, até, interrupções no jacto, provavelmente devido ao grande aumento de carga associado que estes valores de condutividade implicam.

3.3 Processo de electrofiação

Como as soluções e condições atmosféricas se foram alterando ao longo do tempo de elaboração deste trabalho, também os parâmetros de produção de matrizes de nanofibras tiveram de se ir ajustando, tendo-se utilizado a S5 como solução final de produção de matrizes de nanofibras por electrofiação. As soluções S0, S1 e S3 foram utilizadas para comparação de resultados.

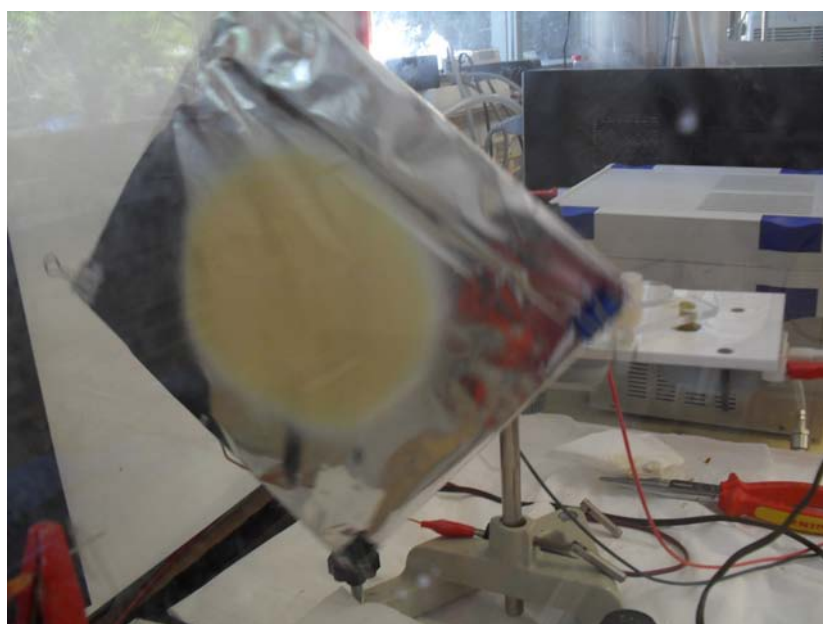
3.3.1 Parâmetros utilizados

Na tabela 3.8, estão referidos os parâmetros de processo utilizados para a produção de matrizes. Na parte dos parâmetros ambientais, está indicada a temperatura ambiente; a humidade relativa ambiente, na altura da produção destas matrizes de nanofibras, era bastante elevada (cerca de 60%), factor que foi possível de contornar através de um fluxo de ar comprimido, que permitiu o controlo da humidade, provocando uma diminuição da mesma. Assim, os valores de humidade, referidos nesta tabela, são resultantes do uso do fluxo de ar comprimido.

As imagens em 3.11 indicam que todas as matrizes produzidas por electrofiação a partir das soluções e nos parâmetros indicados na tabela 3.8 são efectivamente constituídas por nanofibras.

Tabela 3.8: *Parâmetros de processo e ambientais para a electrofiação de cada solução*

Solução	Parâmetros de processo			Parâmetros ambientais	
	d (cm)	V (kV)	f (mL/h)	Temperatura (°C)	Humidade Relativa (%)
S0	15	14	0.5	-	-
S1	16	17.6	0.5	21.2	54.7 a 55.6
S3	14	17.8	0.4	22.4	42.4 a 46.0
S5	16	21.5	0.4	18.5	50.0 a 51.5

Figura 3.10: *Deposição de fibras em colector vertical da solução S5 com os parâmetros referidos na tabela 3.8 - 8 horas de electrofiação*

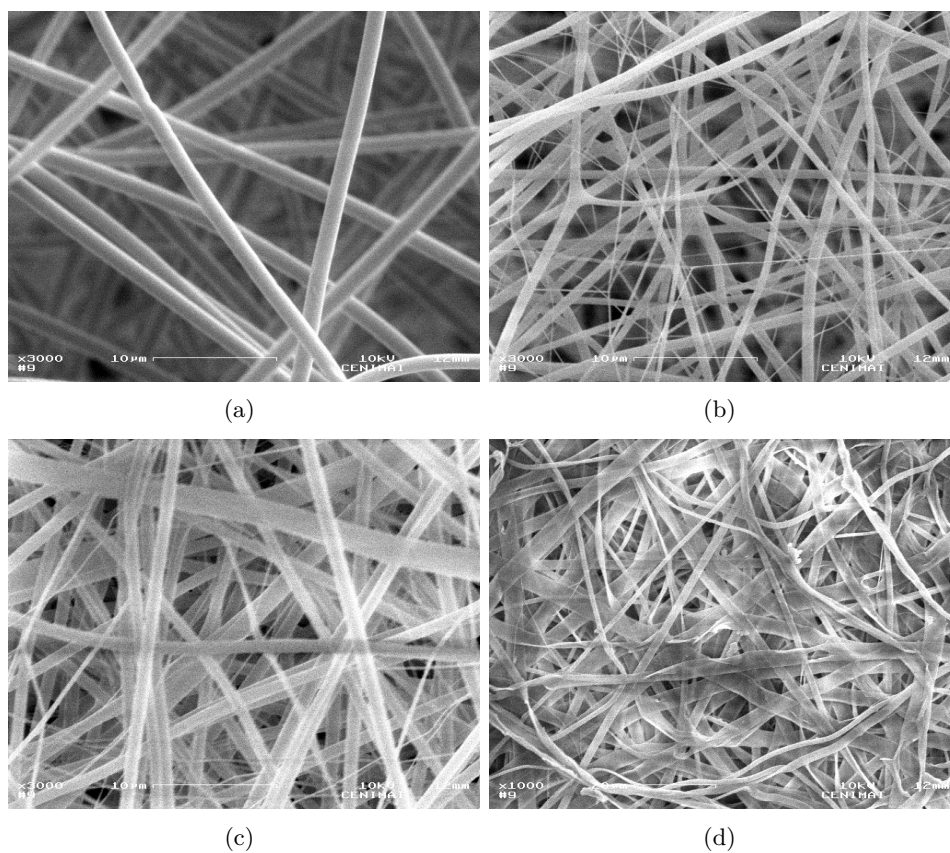


Figura 3.11: Imagem obtida por SEM das matrizes de nanofibras electrofiadas resultantes das soluções S0 (a), S1 (b), S3 (c) e S5 (d) - respectivos parâmetros na tabela 3.8

3.4 Reticulação por irradiação UV

Os filmes são mais fáceis e rápidos de produzir do que as matrizes de nanofibras. Assim, primeiramente, foram efectuados os testes de reticulação por irradiação UV com filmes. Após ter, então, conhecimento sobre o efeito da radiação UV nos filmes, fizeram-se os testes em matrizes.

Os filmes a testar foram cortados em amostras de 10 x 10 mm, medindo-se a espessura (d) e a massa (m_s) de cada uma. As matrizes de nanofibras foram cortadas em amostras com, aproximadamente, 10 x 15 mm.

As amostras foram, em seguida, sujeitas à radiação UV durante diferentes tempos (15 min ($t_{1/4}$), 30 min ($t_{1/2}$), 1 h (t_1), 2 h (t_2), 3 h (t_3), 4 h (t_4), 6 h (t_6), 8 h (t_8), 10 h (t_{10})), sendo viradas a meio do tempo, de modo a garantir uma maior uniformidade na penetração da radiação UV.



Figura 3.12: Amostras de filmes nas caixas de poços em seco (a) e em água (b)

3.4.1 Grau de inchamento

Para determinar o grau de inchamento, as amostras de filmes e matriz de nanofibras foram colocadas em 10 ml de água destilada. As amostras que se dissolveram em contacto com a água destilada foram consideradas solúveis e com insuficiente reticulação. As restantes foram retiradas da água destilada ao fim de 24 h e a água em excesso foi retirada com papel absorvente.

As amostras foram então pesadas (m_h), fotografadas e deixadas a secar sobre folha de acetato. Após a secagem, as amostras foram novamente pesadas ($m_{s'}$) e fotografadas.

Na figura 3.13, podem observar-se os filmes de F0 e F5 após irradiação de UV por 2 h e imersão em água por 24 h. Em geral, após imersão, os filmes de F0 incham muito mais que os filmes de F5, enquanto que nas matrizes de S5 se verifica uma contracção em área. A contracção das matrizes após imersão em água pode ser observada, em pormenor, na figura 3.14 - fotografias das matrizes após irradiação, secas, hidratadas e após secagem.

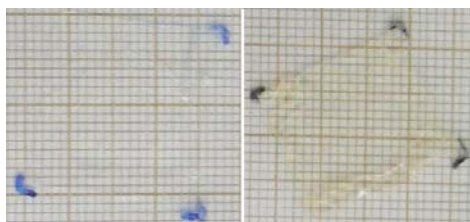


Figura 3.13: Amostras de filmes de F0 e F5 (tamanho original e antes da irradiação UV: 10x10 mm) após 2 h UV e hidratadas

Na figura 3.15 pode observar-se a atenuação de cor após irradiação UV em filmes com diferentes proporções de PVP:PVP-I (18:0, 18:3 e 18:5). Esta atenuação também pode ser verificada na figura 3.14. O facto de ocorrer diminuição da intensidade da cor amarela /laranja, indicativa da presença de iodo, significa que há perda de iodo durante a irradiação.

Foram obtidos gráficos para o grau de inchamento, como o que se mostra na figura 3.16.

É observável que o grau de inchamento é inversamente proporcional ao tempo de irradiação UV, ou seja, quando maior é a exposição à radiação UV, menor é o inchamento. No caso das amostras das matrizes, pela figura 3.14 é possível verificar-se que as amostras reduzem o seu tamanho, relativamente ao seu tamanho original, após a imersão e a secagem. Além disso, observou-se que o tempo de irradiação UV necessário para reticular uma matriz de nanofibras é inferior relativamente à irradiação dos filmes.

Relativamente à perda de massa nos filmes, refere-se um exemplo com irradiação UV durante 5 h: o filme de F0 teve uma perda de massa de 9% e o de F5 uma perda de 18%, o que é sustentado pela confirmação visual da atenuação de cor no caso do filme de F5 e, portanto, pela sua perda de iodo durante a irradiação com UV. No caso das matrizes, não foi possível avaliar a perda de massa, dado que estas ficam muito frágeis após imersão, tornando-se difíceis de manipular para medições de massa.

3.4. RETICULAÇÃO POR IRRADIAÇÃO UV

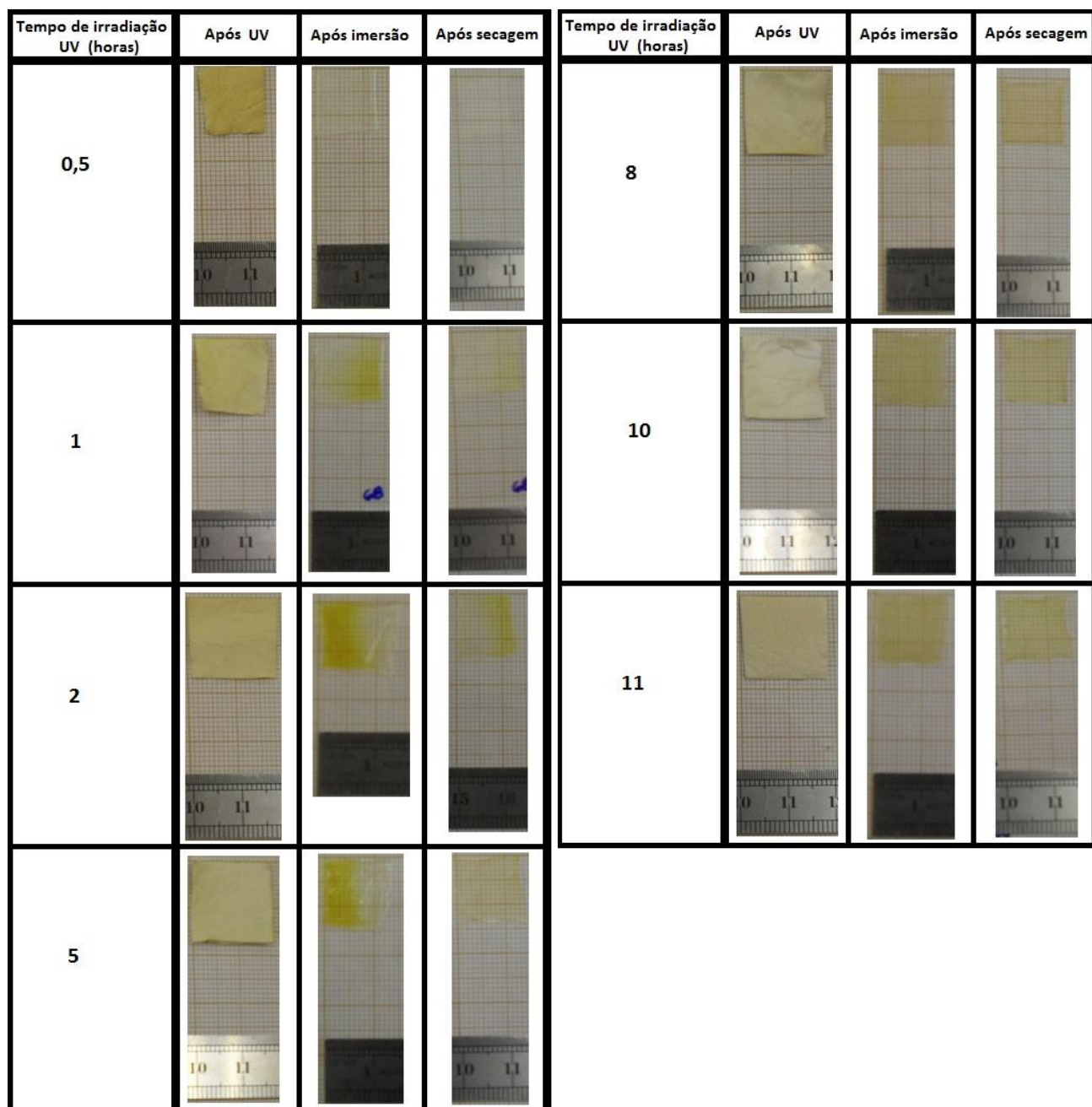


Figura 3.14: Imagens de amostras de matriz de nanofibras de S5 durante o processo da determinação do grau de inchamento



Figura 3.15: Imagens de filmes com diferentes proporções de PVP:PVP-I (da esquerda para a direita, 18:0, 18:3 e 18:5) antes de irradiadas (primeira linha) e após 2 h da irradiação UV (segunda linha)

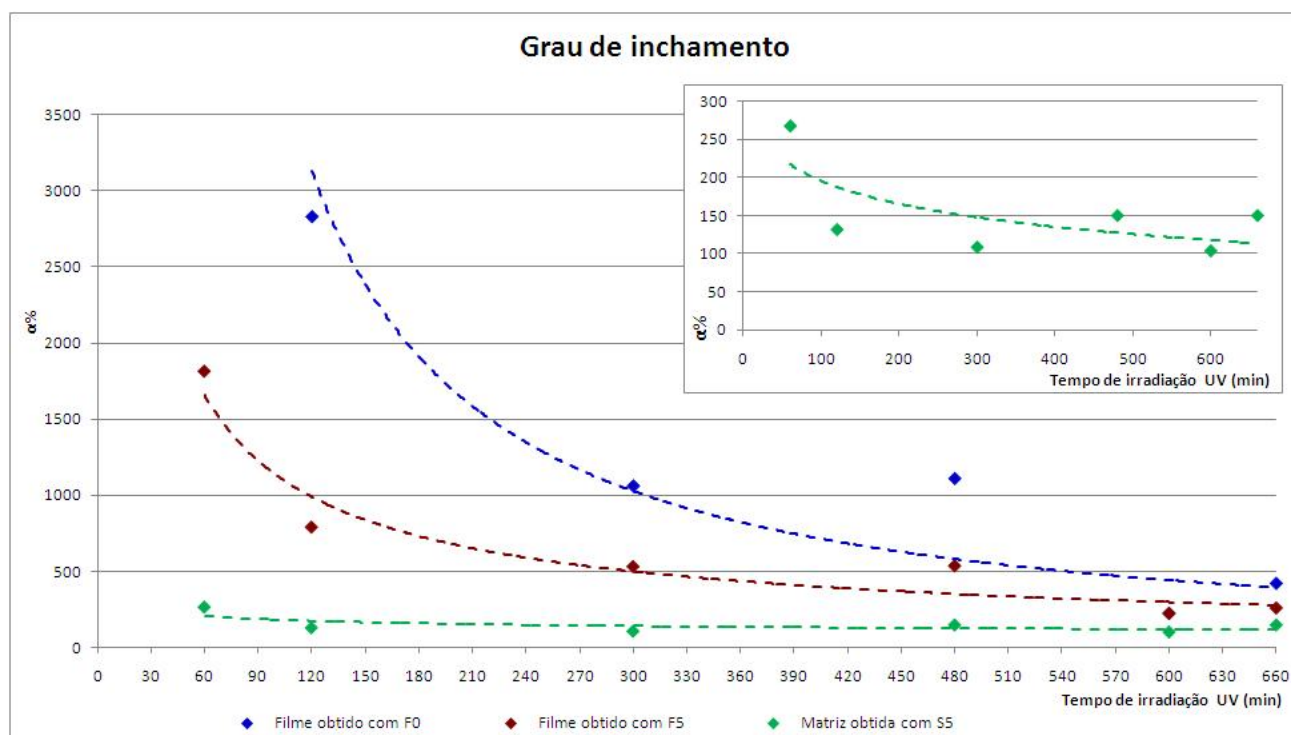


Figura 3.16: Grau de inchamento de filmes de F0 e F5 e da matriz obtida através da solução S5 determinado através da massa m_s

3.5 Taxa de libertação de iodo



Figura 3.17: Soluções com concentração crescente de PVP-I em água

Começou por se fazer espectrofotometria de soluções com diferentes concentrações de PVP-I em água destilada: de 0,005% a 0,100%, a intervalos de 0,005% (alguns dos espectros obtidos estão representados na figura 3.18, na qual se podem observar os picos relativos à espécie I_3^- e, nos espectros das soluções com concentrações mais baixas, o pico - uma ligeira bossa, na figura indicada pela elipse azul- que indica a presença da espécie I_2). Duas horas após os primeiros espectros, fizeram-se novamente espectros das soluções com 0,010%, 0,020%, 0,030%, 0,050% e 0,060% (figura 3.19), tendo-se observado uma diminuição nos valores de absorvância. Como se pode observar na figura 3.19, não existe uma relação linear entre o aumento de concentração de PVP-I e o aumento da absorvância. Há dois factores a considerar para não se poder aplicar a lei de Beer-Lambert neste caso: o pico correspondente à presença de PVP-I está muito próximo dos picos representantes da espécie I_3^- , tendo, além disso, muito maior intensidade que estes (mesmo com concentrações baixas de PVP-I, a absorvância na gama do pico de PVP ultrapassa o valor 2 de absorvância - em espectrofotometria de UV só se devem considerar valores de absorvância até 2, dado que a partir desse valor a leitura do aparelho não é fiável), ou seja, há uma influência do pico de PVP nos picos da espécie I_3^- ; além da influência do pico de PVP, é necessário referir que os dois picos da espécie I_3^- são convoluídos, ou seja, não são picos distintos, havendo portanto interferências de um no outro. Devido a estes dois factores, as absorvâncias ao longo do tempo obedecem a uma curva e não a uma recta. Com base no facto de ter ocorrido uma diminuição das absorvâncias das soluções de PVP-I entre o tempo 0 e as 2 h após a sua preparação, decidiu-se preparar uma solução de 0,02% PVP-I em água destilada e observar os espectros da mesma ao longo do tempo. Na figura 3.20 observa-se, durante os primeiros 20 min, um aumento da absorvância nos picos relativos à espécie I_3^- , ou seja, um aumento de concentração de iodo em solução. Após os 20 min de libertação, as absorvâncias decrescem durante 1 h até ao valor inicial. A partir desse momento, há uma diminuição gradual e de pequena amplitude das absorvâncias. A diminuição da concentração de iodo em solução (relacionada com a diminuição das absorvâncias relativas à espécie I_3^-) justifica-se através da elevada capacidade do iodo volatilizar em soluções aquosas.

Após obter os espectros de soluções de concentrações de PVP-I conhecidas, considerou-se como concentração de referência, para dimensionar as matrizes a usar nos testes de libertação de iodo, a de 0,040%, já que os valores de absorvância dos picos referentes ao I_3^- se situam numa gama aceitável (inferior a 2 e superior a 0,5). Assim, para os testes de taxa de libertação

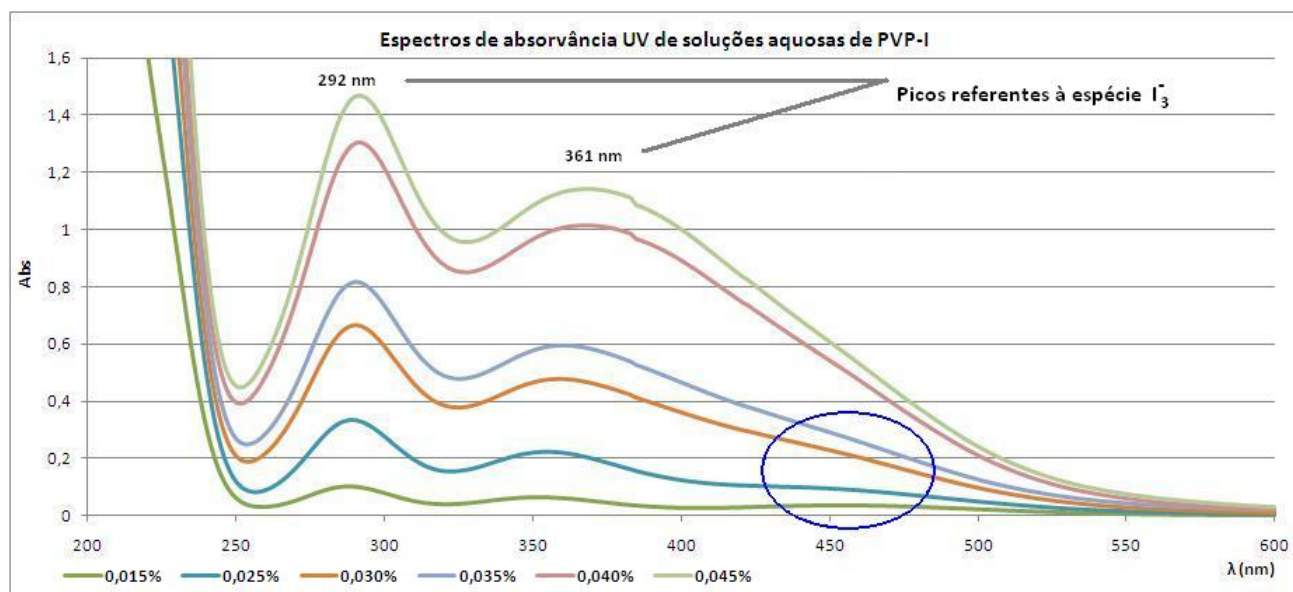


Figura 3.18: Espectros UV de soluções com diferentes concentrações de PVP-I

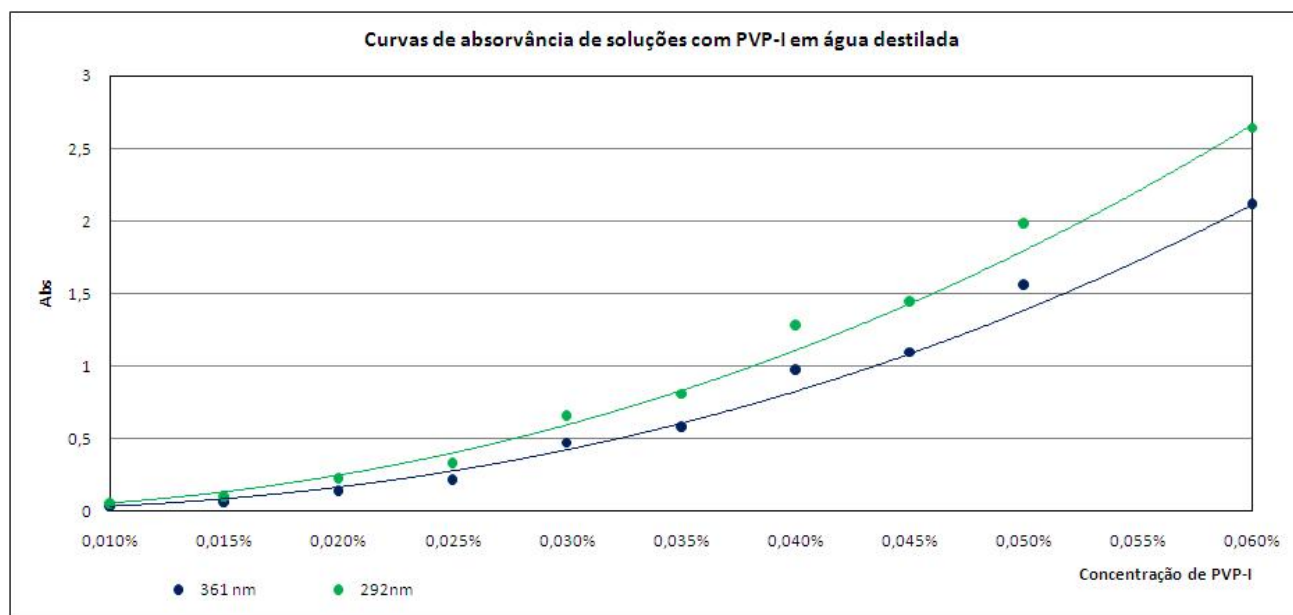


Figura 3.19: Absorvância nos comprimentos de onda 361 nm e 292 nm em soluções com diferentes concentrações de PVP-I

de iodo, a amostra de matriz de nanofibras de S5 teria de ter massa suficiente para libertar iodo que, em solução, atingisse absorvâncias equivalentes à solução de 0,040% de PVP-I.

As amostras de nanofibras de S5 foram sujeitas a diferentes tempos de reticulação (1 h (t_1), 3 h (t_3), 4 h (t_4), 6 h (t_6), 8 h (t_8), 10 h (t_{10})). Para obter no máximo uma concentração de 0,040% PVP-I durante a libertação, considerou-se $m_{H_2O} = 2,710$ g (massa de água destilada) e, através da massa de PVP-I encontrada no cálculo em 3.1 e utilizada de seguida no cálculo

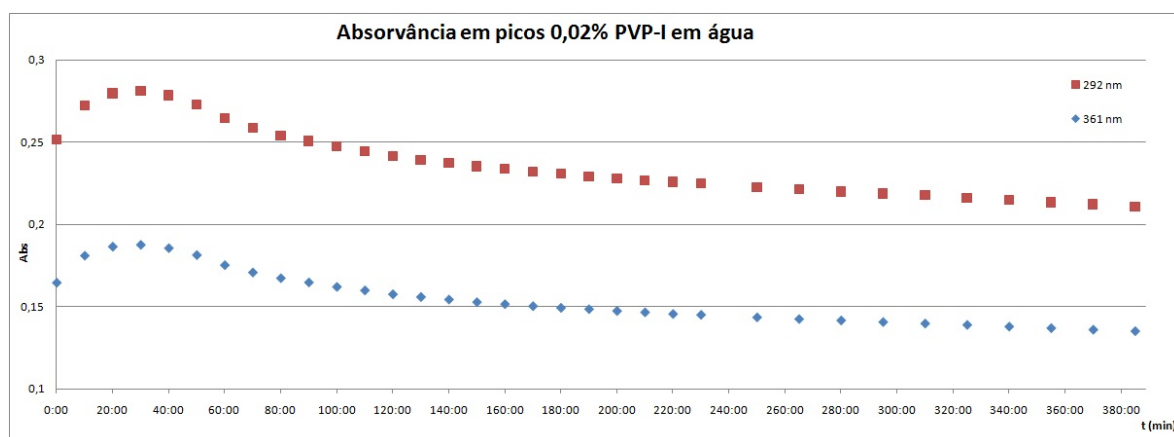


Figura 3.20: Absorvância nos comprimentos de onda 361 nm e 292 nm numa solução 0,02% PVP-I em água destilada ao longo do tempo

em 3.2, determinou-se que as amostras teriam de ter 0,005 g de massa.

$$\frac{0,04}{100} = \frac{m_{PVP-I}}{m_{H_2O}} \quad (3.1)$$

$$\frac{5\%PVP - I}{5\%PVP + 18\%PVP} = \frac{m_{PVP-I}}{m_{matriz}} \quad (3.2)$$

Pela figura 3.21 verifica-se que a curva de absorvância da libertação de iodo da matriz de nanofibras de S5 é ligeiramente inferior em valor do que a da solução de 0,030% PVP-I. Tendo em conta que a quantidade de matriz de nanofibras utilizada para os testes de libertação de iodo foi dimensionada de modo a libertar um máximo de 0,040% de PVP-I, e que, portanto, uma matriz com o equivalente a 0,040% PVP-I liberta no máximo um valor próximo dos 0,030%, pode concluir-se que há perda de iodo da matriz durante a irradiação da matriz, o que se pode verificar por observação das matrizes antes e após irradiação (figura 3.14 da secção 3.4) - a intensidade da cor amarela diminui após irradiação, sendo tanto maior a perda de intensidade quanto maior é a exposição à luz UV - e durante a aquisição dos espectros, dado que o iodo, em soluções aquosas, volatiliza rapidamente.

As curvas representadas nas figuras 3.22 e 3.23 (curvas muito semelhantes, apenas com diferença nos valores de absorvância, que para $\lambda=292$ nm tem de ser superior a $\lambda=361$ nm) mostram que há, inicialmente, um grande aumento da absorvância, seguida de um patamar em que há uma ligeira e gradual diminuição do valor de absorvância. Ou seja, a concentração de iodo na água destilada (inferida pela avaliação da absorvância na gama dos picos da espécie I_3^-), aumenta inicialmente e depois mantém-se relativamente constante. Relativamente à comparação dos diferentes tempos de irradiação nas curvas das figuras 3.22 e 3.23, verifica-se que a absorvância máxima da espécie I_3^- nas matrizes de nanofibras de S5 com 1 h (ao fim de 6:30 min), 6 horas e 8 h (ambos ao fim de 27:30 min) de irradiação se dá mais cedo do

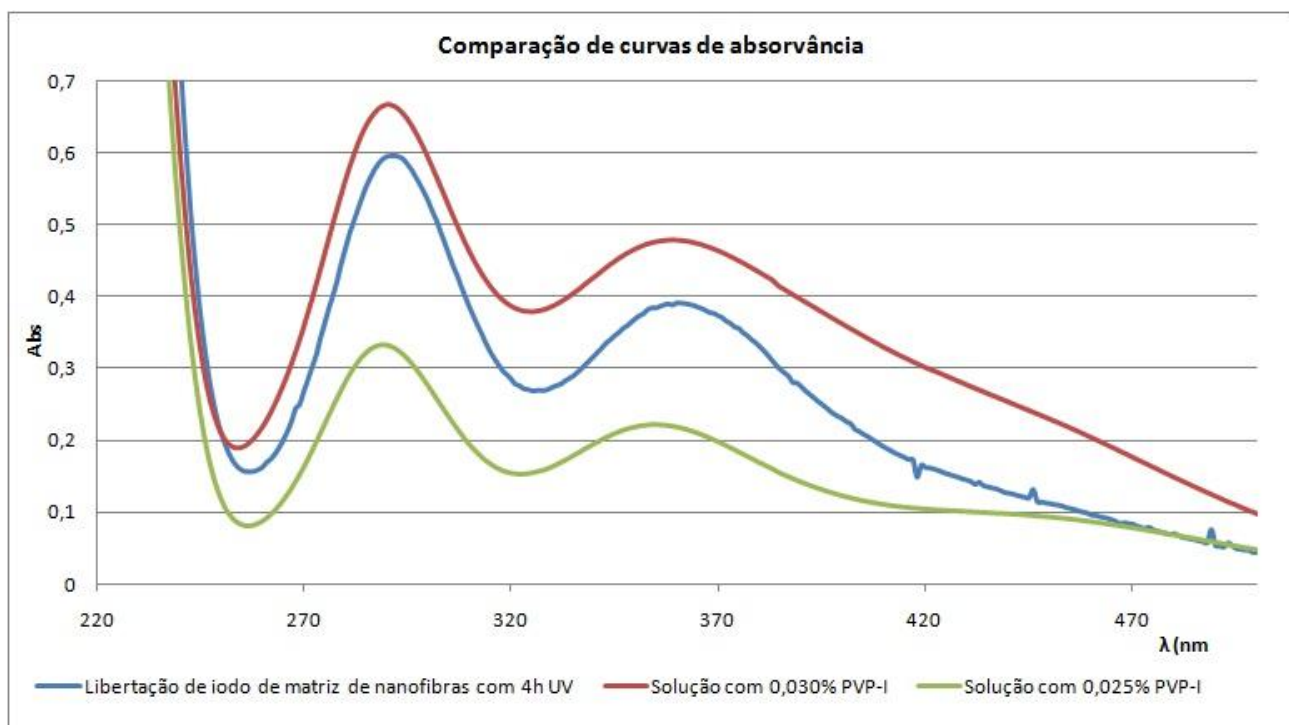


Figura 3.21: Comparação entre curvas de absorvância de soluções com libertação de iodo da matriz de nanofibras

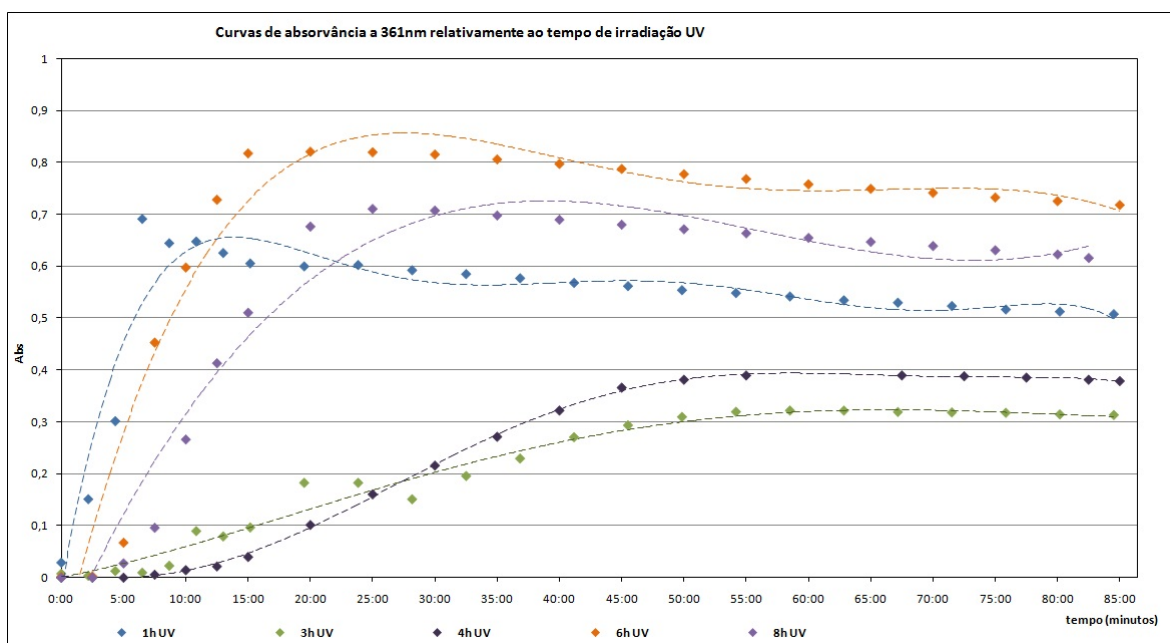


Figura 3.22: Evolução temporal nos comprimentos de onda 361 nm de espectros de solução com libertação directa de iodo de matrizes de nanofibras de S5 e com diferentes tempos de irradiação UV

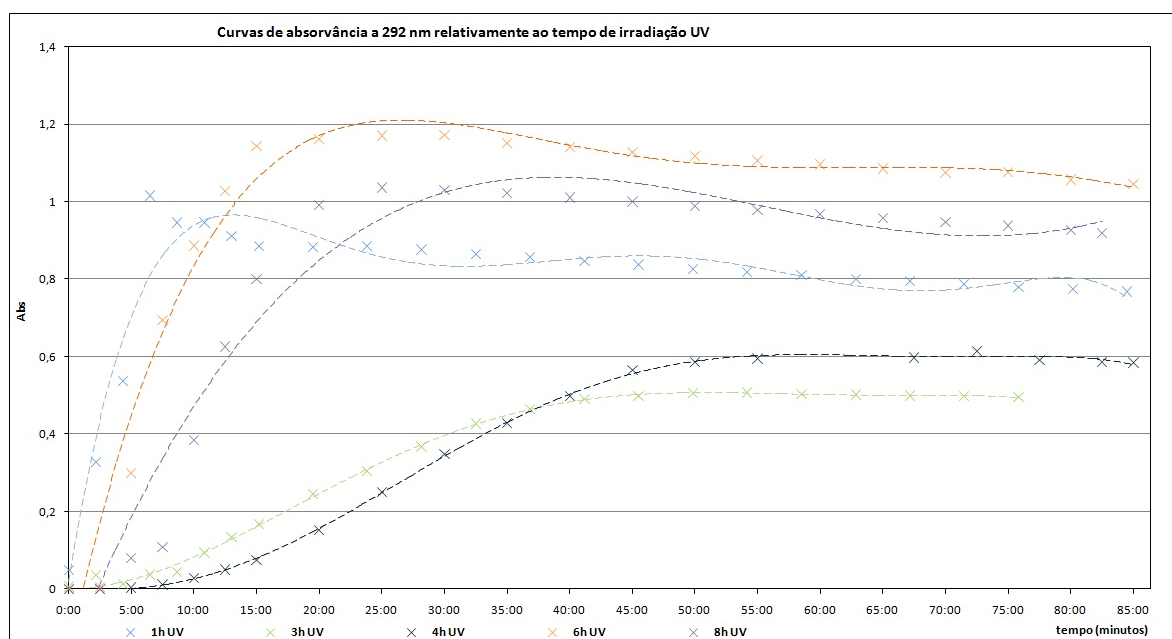


Figura 3.23: Evolução temporal nos comprimentos de onda 292 nm de espectros de solução com libertação directa de iodo de matrizes de nanofibras de S5 e com diferentes tempos de irradiação UV

que no caso da irradiação durante 3 h (ao fim de 52 min) ou 4 h (ao fim de 67 min). A partir destes resultados, pode concluir-se que:

- a reticulação com 1 h não foi eficaz (a concentração máxima de iodo atingiu-se demasiado depressa, significando que não ocorreu uma insolubilização eficaz);
- a partir das 6 h de irradiação UV, há degradação da matriz de nanofibras, o que provoca uma libertação mais rápida do iodo;
- após ser atingida a absorvância máxima verifica-se uma ligeira diminuição devido à volatilização do iodo das soluções aquosas;

Dado que se pretende uma libertação gradual de iodo, e como o tempo ao fim do qual se atinge a concentração máxima do iodo em solução é maior para a matriz irradiada durante 4 h, foi esta a escolhida para os testes microbiológicos.

3.6 Testes microbiológicos

3.6.1 Curva de crescimento

Para traçar a curva de crescimento, começou por se diluir as culturas bacterianas e fúngicas de modo a obter leituras de densidade óptica entre 0,03 e 0,12. As culturas foram colocadas em balões na estufa a 37°C sendo somente retiradas para medição de densidade óptica e

plaqueamento nos seguintes tempos: 0, 1 h, 2 h, 3 h, 5 h e 6 h. No tempo 6,5 h foi somente medida a densidade óptica.

As diluições e respectivos plaqueamentos foram os seguintes:

Tempo de incubação (horas)	Diluições				
	10^{-2}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
0	x	x			
1	x	x			
2	x	x		x	
3	x	x	x	x	x
4	x	x	x	x	x
5 ^a		x	x	x	x

^aPara a *C. albicans* só foram efectuadas as diluições 10^{-6} e 10^{-7}

A partir das contagens efectuadas nas placas, determinaram-se as curvas de crescimento das colónias e as curvas de densidades ópticas DO₆₀₀, que estão representadas na figuras 3.24.

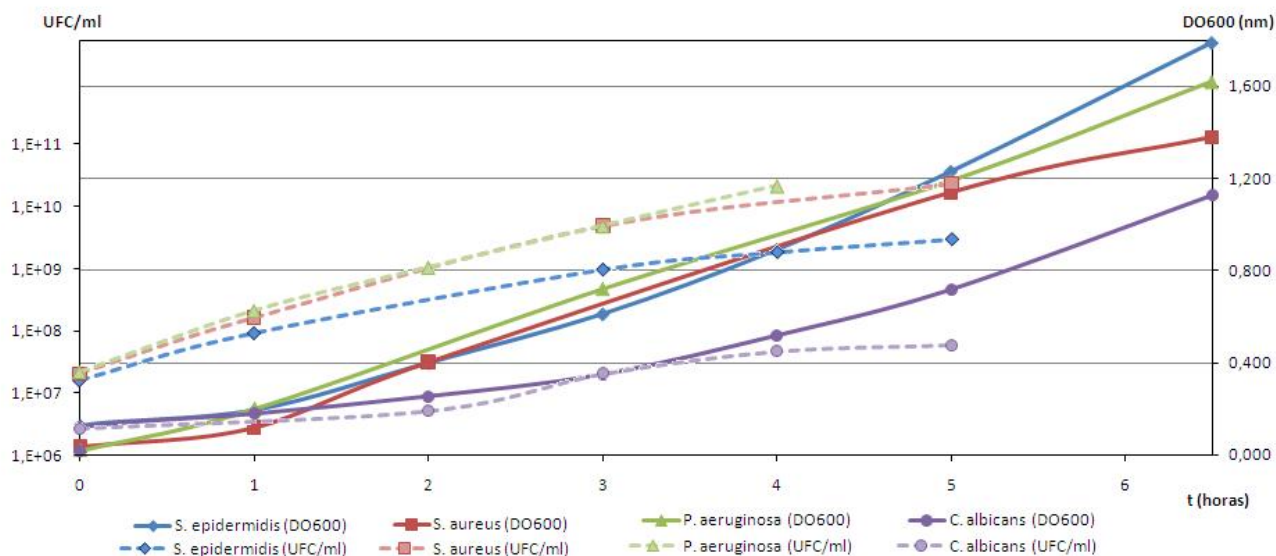


Figura 3.24: Curvas de crescimento das estirpes bacterianas *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 e fungo *Candida albicans* PYCC 3436T - através de UFC/ml (Unidades de Colónias Formadas/ml) e DO₆₀₀ (Densidade óptica das culturas a 600nm)

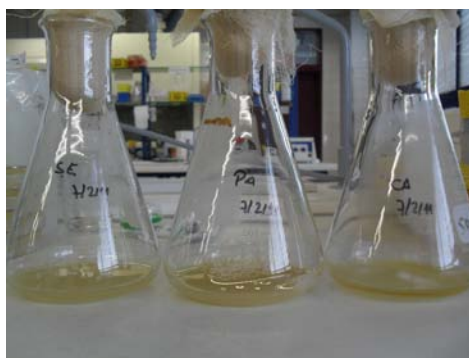
Na tabela 3.9, pode ser consultada a DO₆₀₀, que foi utilizada para obter cada concentração de cultura bacteriana e/ou fúngica no decorrer dos trabalhos. Estes dados foram obtidos através das curvas de crescimento.

Na figura 3.25 podem ser observados balões, com as estirpes e meios de crescimento,

Tabela 3.9: Correspondência entre DO_{600} e UFC

Estirpe	UFC/ml	DO_{600}
<i>S. epidermidis</i>	10^5	0,005
	10^7	0,020 a 0,100
<i>S. aureus</i>	10^5	0,005
	10^7	0,020 a 0,100
	10^8	0,120 a 0,400
<i>P. aeruginosa</i>	10^5	0,005
	10^7	0,020 a 0,100
<i>C. albicans</i>	10^5	0,020
	10^6	0,120 a 0,260

utilizados nos testes microbiológicos.

Figura 3.25: Balões com culturas de *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*

3.6.2 Determinação da concentração mínima inibitória

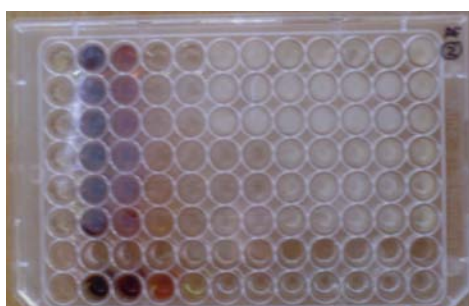


Figura 3.26: Placa de poços (8×12) utilizada para testes de CMI

Para os testes de CMI, a concentração utilizada foi de 10^7 UFC/ml para as estirpes *S.aureus*, *S.epidermidis* e *P.aeruginosa* e de 10^6 UFC/ml para a estirpe *C.albicans*. As observações foram efectuadas após o tempo de incubação das culturas.

Os testes foram realizados em placas de poços 8 x 12 (96 poços) com 100 μ l de diluição de produto (tabela 3.10) e 100 μ l de cultura, como explicado no Anexo B.

Tabela 3.10: *Diluições de PVP-I*

Diluições	Concentração PVP-I (μ g/ml)
D0	$51,2 \times 10^3$
D1	$25,6 \times 10^3$
D2	$12,8 \times 10^3$
D3	$6,4 \times 10^3$
D4	$3,2 \times 10^3$
D5	1600
D6	800
D7	400
D8	200
D9	100
D10	50

As placas de poços utilizadas para os testes de CMI (como a da figura 3.26) estão representadas por meio de tabelas, que se aproximam esquematicamente das mesmas (ver figura B.1 no Anexo B). Os resultados obtidos nas placas estão indicados na figura 3.27. O sinal '+' (positivo) significa crescimento da cultura (observando-se turvação), enquanto que, por oposição, o sinal '-' (negativo) significa ausência de crescimento da cultura (observando-se limpidez).

As CMI encontradas de PVP-I, para cada estirpe, estão indicadas na tabela 3.11.

Tabela 3.11: *Resultados CMI de PVP-I*

Estirpe	CMI de PVP-I (μ g/ml)
<i>S. epidermidis</i>	3200
<i>S. aureus</i>	3200
<i>P. aeruginosa</i>	6400
<i>C. albicans</i>	1600

Tendo em conta os resultados de CMI obtidos, para os testes de libertação de iodo em cultura, seria preciso ter matrizes de nanofibras, produzidas a partir das soluções iniciais (com 15% PVP e 1% PVP-I), muito espessas e pesadas, o que seria difícil obter (por exemplo, para fazer os testes de libertação em *S. aureus*, seria necessária uma massa de 0,512 g de matriz). Assim, decidiu-se aumentar a concentração de 1% para 5% de PVP-I nas soluções para produzir matrizes, de modo a ser mais simples obter matrizes com massa suficiente para os testes de libertação de iodo em cultura.

PLACA 1												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	LB	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
B	LB	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
C	LB	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
D	LB	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
E	LB	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
F	LB	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
G												
H												
	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	

→ *S. epidermidis*
10⁷ UFC/ml

→ *S. aureus*
10⁷ UFC/mL

(a)

PLACA 2												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	LB	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
B	LB	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
C	LB	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
D	YM	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
E	YM	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
F	YM	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
G												
H												
	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	

→ *P. aeruginosa*
10⁷ UFC/mL

→ *C. albicans*
10⁶ UFC/mL

o valor alterou de "-" para "+" entre as 24h e as 48h de incubação

(b)

Figura 3.27: Resultados esquemáticos da CMI da placa 1 (a) e da placa 2 (b) com PVP-I - significado dos sinais: '+' - crescimento celular por observação de turvação; '-' - ausência de crescimento por observação de ausência de turvação

3.6.3 Teste Kirby-Bauer ou de difusão em agar

Para estes testes, em meio de cultura em placa de *Petri*, espalhou-se (com esferas de vidro) um volume de inóculo de 100 μ l de 10⁵ UFC/ml de cada estirpe a ser testada.

Todas as soluções a serem testadas foram filtradas (filtro com poros de 0,45 μ m) e um volume de 20 μ l foi pipetado na superfície do disco de papel estéril (\varnothing =8mm)

Para testar as matrizes de nanofibras electrofiadas e reticuladas (a irradiação com UV, além de, como já observado, insolubilizar a matriz de nanofibras e melhorar o grau de libertação do produto anti-séptico, também providencia a esterilidade das mesmas), cortou-se um disco das matrizes com \varnothing =1 cm.

Os discos impregnados de soluções e os discos de nanofibras foram colocados nas placas com uma pinça esterilizada pressionando-se ligeiramente de modo a haver boa adesão ao meio com agar.

Verificou-se que, ao serem colocados na placa com cultura, os discos de matrizes de nanofibras sofreram uma retracção, ficando com diâmetro inferior ao original (esta ligeira contracção

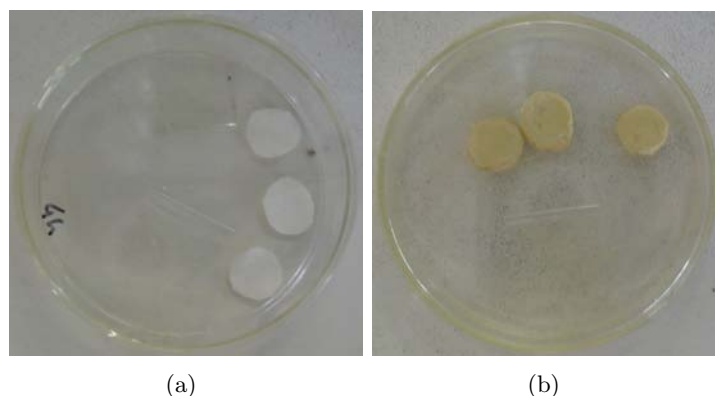


Figura 3.28: Discos de matrizes de nanofibras da solução S0 (a) e da solução S5 (b) em placas esterilizadas após 4 h de irradiação UV

foi já observada nos testes de inchamento - secção 3.4, figura 3.14).

As placas foram colocadas em estufa a 37°C durante o tempo de incubação de 24 h ou 48 h, dependendo da cultura, sendo registados os resultados ao fim desses tempos. As placas foram, de seguida, colocadas à temperatura ambiente e na ausência total de luz. Deste modo, foi possível ir observando as mesmas ao longo de duas semanas, verificando-se que a dimensão das zonas de inibição permaneciam inalterada.

Os testes de difusão foram efectuados para todas as estirpes com discos impregnados com solução T05 (ver tabela 2.4) e com matrizes de nanofibras electrofiadas das soluções S0 ($m=0,003g$ em todos os discos) e S5 ($m=0,013g$ e espessura 1,010 mm em todos os discos) com tempo de irradiação UV de 4 h (figura 3.29).

Além disso, contra a estirpe *S. aureus* foram efectuados os testes de comparação: diferentes tempos de reticulação de uma mesma matriz de nanofibras (matriz de nanofibras electrofiadas das soluções S0 e S5 com irradiação UV de 1 h, 3 h, 4 h, 6 h e 8 h); diferentes concentrações de PVP-I nas matrizes de nanofibras (electrofição das soluções S1, S3 e S5) com o mesmo tempo de reticulação (4 h) (figura 3.30); diferentes concentrações de PVP-I (soluções T01, T02, T03, T04, T05) e efeito do PVP por si só (solução T10) - figura 3.31.

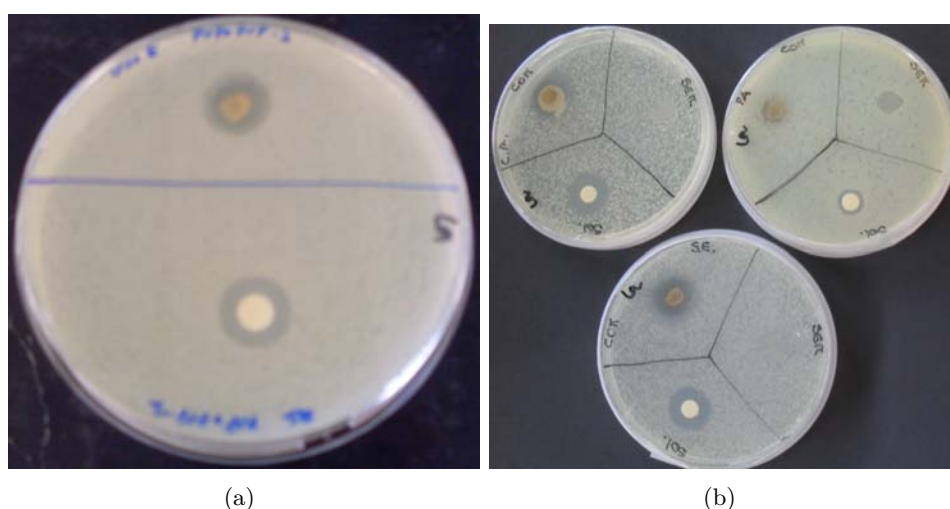
Em todos os testes, procedeu-se em paralelo ao controlo de esterilidade de materiais e/ou soluções usadas, ou seja, não foi observado qualquer crescimento de contaminantes quando as matrizes e/ou soluções foram colocadas em meio constituído apenas com agar, não tendo havido, portanto, contaminação das matrizes e/ou soluções usadas nos testes de difusão.

No caso dos testes de difusão para matrizes de nanofibras produzidas a partir da solução S0, em nenhum houve zona de inibição de crescimento bacteriano e/ou fungico em redor destes discos.

Após a conclusão directa de que o PVP, por si só, não possui qualquer acção biocida, diversas conclusões se podem retirar dos resultados obtidos: de acordo com a tabela 3.12, a matriz de nanofibras de S5 e a solução T05 têm acções semelhantes, sendo que, para ambas,

Tabela 3.12: Resultados dos testes de difusão contra todas as estirpes com solução T05 e matriz de nanofibras de S5 com 4 h UV

Estirpe	Zona de inibição (mm)	
	Matriz de nanofibras S5	T05
<i>S. epidermidis</i>	15,0	15,5
<i>S. aureus</i>	17,0	16,0
<i>P. aeruginosa</i>	10,0	11,0
<i>C. albicans</i>	19,5	16,5

Figura 3.29: Resultados dos testes de difusão com solução T05 e matriz de nanofibras de S5 e S0 com 4 h UV contra as estirpes *S. aureus* (a), *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* (b)Tabela 3.13: Resultados dos testes de difusão contra a estirpe *S. aureus* com matriz de nanofibras de S5 com diferentes tempos de irradiação UV

Tempo de irradiação UV (horas)	massa do disco (g)	Zona de inibição (mm)
1	0,013	16,0
3	0,012	16,0
4	0,013	17,0
6	0,009	9,0
8	0,010	12,0

é observável uma acção biocida menos intensa para a estirpe *P. aeruginosa*, aumentando na estirpe *S. epidermidis*, seguida da *S. aureus* e, finalmente, da estirpe *C. albicans*, para a qual se observam zonas de inibição maiores; pela tabela 3.13, observa-se que os tempos de irradiação UV mais convenientes serão os de 1, 3 e 4 horas, sendo que a acção biocida das matrizes com 6 e 8 horas UV é mais diminuta (deve referir-se que a massa das mesmas também é inferior

Tabela 3.14: Resultados dos testes de difusão contra a estirpe *S. aureus* com matriz de nanofibras de S0, S1 e S5 com 4 h de irradiação UV

Solução para matriz	massa do disco (g)	Zona de inibição (mm)
S1	0,013	12,5
S3	0,013	13,0
S5	0,013	17,0

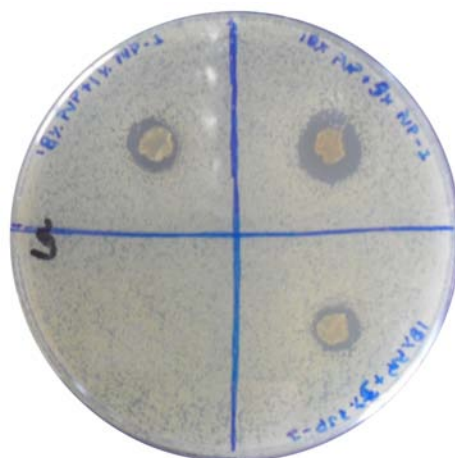


Figura 3.30: Imagens dos testes de difusão contra a estirpe *S. aureus* com matriz de nanofibras electrofiadas da solução S1 (canto superior esquerdo), S3 (canto inferior direito) e S5 (canto superior direito)

Tabela 3.15: Resultados dos testes de difusão contra a estirpe *S. aureus* com diferentes soluções de PVP e PVP-I

Solução	Zona de inibição (mm)
T01	11,5
T02	14,0
T03	16,0
T04	16,5
T05	17,5
T10	0

às matrizes com os menores tempos de irradiação, no entanto, a diminuição da acção biocida é maior do que a diminuição da massa); como já esperado, a acção biocida das matrizes e das soluções é tanto maior quanto maior for a percentagem de PVP-I nas mesmas (tabelas 3.14 e 3.15), ou seja, a matriz de nanofibras de S5 é bastante mais eficaz que a de S1 e o mesmo se verifica comparando a acção biocida entre a solução T05 e a solução T01.

A intensidade da acção biocida das matrizes (relacionada com a extensão das zonas de inibição) está de acordo com os valores de CMI encontrados (ver tabela 3.11): a estirpe com

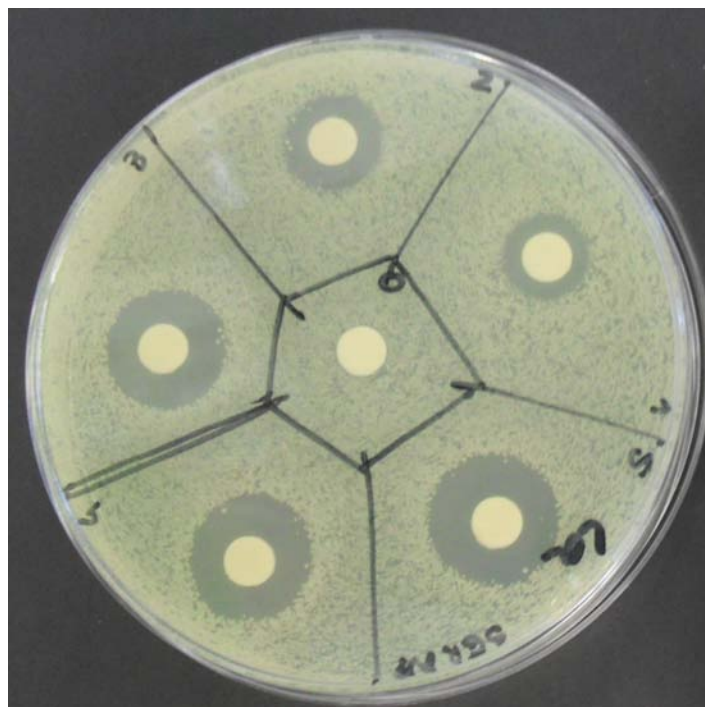


Figura 3.31: Imagens dos testes de difusão contra a estirpe *S. aureus* com soluções de diferentes proporções de PVP-I (testes com soluções T01 a T05) e de PVP (teste com solução T10 ao centro)

CMI mais elevado é a *P. aeruginosa* e é aquela em que a acção biocida da matriz é menos intensa; a mesma relação pode ser verificada pela zona de inibição mais extensa no caso do teste contra a estirpe *C. albicans*, que é a que apresenta a CMI mais baixa.

Os resultados obtidos foram observados durante cerca de 2 semanas, não tendo havido alterações aos mesmos.

3.6.4 Testes de libertação de iodo em cultura

Para determinar a massa de matriz de nanofibras, produzida a partir de S5, a utilizar no teste de libertação de iodo em cultura, consideraram-se diversos factores: o volume de LB (10 ml), a CMI da estirpe *S. aureus* (3200 µg/ml) e a quantidade máxima de iodo que se poderia libertar a partir da matriz de nanofibras (proveniente de S5). Para o último factor, tiveram-se em conta os resultados da espectrofotometria de libertação: considerando que uma matriz de nanofibras, que deveria libertar¹, para os 10ml de LB, o iodo equivalente a uma solução com a concentração de 0,040% de PVP-I só liberta o iodo equivalente a uma concentração de 0,030% (este valor é mais reduzido devido às perdas de iodo que ocorrem durante a electrofiação e a irradiação com UV), uma matriz com uma proporção de massas de PVP-I:PVP de 5%:18%, só libertará, no máximo, o equivalente a uma matriz que possua uma proporção PVP-I:PVP

¹admitindo que as matrizes retêm todo o iodo correspondente à quantidade de PVP-I usada na sua produção



Figura 3.32: Material utilizado nos testes de libertação

de 3,75%:18%. A massa de matriz de nanofibras de S5 ($m_{matrizS5}$) utilizada neste teste foi, assim, de 0,19 g (correspondente ao cálculo 3.3).

$$\frac{3,75}{5 + 18} = \frac{3200\mu g/ml}{m_{matrizS5}} \times 10ml \quad (3.3)$$

Para os tempos 0, 30, 60 e 90 min foram plaqueadas diluições de 10^{-3} da suspensão celular em contacto com a matriz de nanofibras em balão. Após 24 h, como a suspensão celular no balão estava límpida, não foi efectuada qualquer diluição, sendo o plaqueamento feito directamente da suspensão celular não diluída. Na tabela 3.16 estão indicadas as concentrações de microorganismos nas placas relativas aos testes de libertação de iodo em cultura.

Tabela 3.16: Resultados do teste de libertação de iodo da matriz de nanofibras de S5 contra a estirpe *S. aureus*

Tempo de contacto	UFC/ml
0 min	$7,7 \times 10^5$
30 min	$5,0 \times 10^5$
60 min	$5,0 \times 10^4$
90 min	$5,0 \times 10^4$
24 h	0



Figura 3.33: Balões com cultura *S. aureus* e matrizes de nanofibras de S0 (à esquerda) e S5 (à direita)

Também se plaqueou a suspensão celular em balão de uma cultura semelhante à anterior, mas onde foi colocada uma matriz de nanofibras fiadas a partir de S0. Decorridas 24 h após a colocação da matriz no balão, a cultura permanecia turva. Plaqueou-se com uma diluição de 10^{-4} e o resultado foi incontável, ou seja, havia uma densidade bastante superior a 300 colónias na placa (superior, portanto, a 10^7 UFC/ml).

Como se pode observar na figura 3.33, numa fotografia tirada 48 h após a colocação das matrizes nos balões com cultura, o balão com a matriz de nanofibras de S0 uma suspensão celular densa ou turva, enquanto que o balão com a matriz de nanofibras de S5 está translúcido. Tal significa que houve crescimento celular no balão com a matriz de nanofibras de S0 (provavelmente com concentração superior a 10^9 UFC/ml) e que não houve crescimento bacteriano no balão com a matriz de nanofibras proveniente de S5.

Pela tabela 3.16, pode concluir-se que houve libertação gradual do iodo ao longo do tempo, sendo que a acção biocida do iodo é visível a partir dos 60 min (compatível com os resultados da espectrofotometria de libertação, em que a concentração máxima ocorria aos 67 min para matrizes de nanofibras de S5 irradiadas durante 4 h com UV), tendo a morte e/ou inactivação celular ocorrido entre os 90 min e as 24 h após o contacto entre a matriz e a cultura. Pela figura 3.33, pode dizer-se também que a acção biocida foi eficaz durante pelo menos 48 h, sendo que, provavelmente, provocou danos (irreversíveis ou não - não se efectuaram testes para determinar se as células estavam mortas ou apenas inibidas de se multiplicar) nas bactérias, não podendo estas proliferar.

Capítulo 4

Conclusões

Neste trabalho foi possível produzir matrizes de nanofibras pelo método, relativamente simples e barato, de electrofiação a partir de soluções com diferentes proporções de PVP e PVP-I. Foi detectada alguma dificuldade na produção das fibras com determinadas condições atmosféricas, como humidade reduzida e temperatura elevada.

Além disso, uma das dificuldades com as soluções e as matrizes contendo PVP-I é a volatilidade do iodo (durante a irradiação das matrizes e filmes com UV e em soluções aquosas) e a sua degradação com luz solar; portanto, é aconselhável proteger as mesmas da luz solar (com papel de alumínio) e tentar que os testes de propriedades físicas, de espectrofotometria e microbiológicos sejam efectuados no dia da produção das soluções.

Após variadas tentativas, o sistema preparado para obter espectros UV provenientes da libertação do componente da matriz de nanofibras resultou, dado que havia agitação do líquido, permitindo a homogeneização constante do mesmo, e, devido à rede, a matriz não entrou em contacto com o magneto, pelo que não se desfez.

Através dos testes de grau de inchamento e de espectrofotometria UV de libertação de iodo, foi possível conhecer um tempo óptimo de irradiação UV, as 4 horas, uma vez que, com este tempo de irradiação UV, ocorreu, de facto, reticulação das matrizes (não se dissolveram em água após a irradiação) e a libertação de iodo foi gradual e demorada (a concentração máxima de iodo na solução foi obtida ao fim de um tempo superior ao dos outros tempos de irradiação UV - ao fim de 67 minutos).

Relativamente aos testes microbiológicos, estes permitiram que se desenvolvesse algum conhecimento na área da microbiologia. Os resultados destes testes foram de encontro às expectativas, tanto nos testes de difusão como nos testes de libertação, dado que houve provas da acção biocida gradual e constante das matrizes de nanofibras. Assim, as matrizes de 18% PVP com 5% PVP-I, após irradiação de UV durante 4 horas, são óptimas candidatas à cobertura de feridas, pois permitem que haja manutenção de fluidos da mesma e trocas gasosas (devido à sua porosidade) e possuem acção biocida contra as estirpes testadas neste trabalho.

De modo a melhorar este trabalho, dever-se-ia proceder ao encapsulamento das fibras de PVP-I num polímero durante a electrofiação (por exemplo, um sistema co-axial), de modo a que as matrizes não libertassem nenhum iodo para o ar durante o processo de produção e durante o tempo entre produção e utilização e para que pudesse haver um melhor controlo da taxa de libertação de iodo; dever-se-ia estudar melhor o processo de reticulação e as suas consequências, por exemplo, fazendo espectrofotometria e FTIR (Infravermelho por transformada de Fourier; em inglês, *Fourier transform infrared spectroscopy*) das matrizes; dever-se-iam efectuar os restantes testes de libertação de iodo com as restantes estirpes e com outras estirpes susceptíveis de provocar facilmente infecções em feridas superficiais e, como teste final, dever-se-ia testar a citotoxicidade da matriz, de modo a verificar se a mesma pode ser aplicada em feridas sem haver perigo de sobredosagem de iodo.

Bibliografia

- [1] Hong Y. et al. Electrospinning of multicomponent ultrathin fibrous nonwovens for semi-occlusive wound dressings. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2008.
- [2] Bhardwaj N. and Kundu S.C. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advance*, 28:325–347, 2010.
- [3] Frenot A. and Chronakis I.C. Polymer nanofibers assembled by electrospinning. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 8:64–75, 2003.
- [4] Ignatova M., Markova N., Manolova N., and Rashkov I. Antibacterial and antimycotic activity of a cross-linked electrospun poly(vinyl pyrrolidone)-iodine complex and poly(ethylene oxide)/poly(vinyl pyrrolidone)-iodine complex. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn*, 19(3):373–386, 2008.
- [5] Ignatova M., Manolova N., and Rashkov I. Electrospinning of poly(vinyl pyrrolidone)-iodine complex and poly(ethylene oxide)/poly(vinyl pyrrolidone)-iodine complex - a prospective route to antimicrobial wound dressing materials. *European Polymer Journal*, 43:1609–1823, 2007.
- [6] *Dicionário da Língua Portuguesa*, 8^a ed. Porto Editora, 1999.
- [7] Okamoto T., Jardim Junior E.G., Tanaka R.A., and Magro Filho O. Influência da antisepsia com pvp-i sobre o crescimento bacteriano em suturas com fio de poliéster, estudo microbiológico e histomorfológico em ratos. *Arq. Ciênc. Saúde Unipar*, 6(2):93–97, 2002.
- [8] Trabulsi L.R. and Alterthum F. *Microbiologia*, 4a ed. Atheneu, 2004.
- [9] Kasilo O.J. and Nhachi C.F.B. Iodine. <http://www.inchem.org/documents/pims/pharm/iodine.htm>, 1991.
- [10] ICHEM: ICSC. Iodine. <http://www.inchem.org/documents/icsc/icsc/eics0167.htm>, 2004.

- [11] Punyani S., Narayana P., Harpal S., and Vasudevan P. Iodine based water disinfection: A review. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 65:116–120, 2006.
- [12] Gazda D.B., Lipert R.J., Fritz J.S., and Porter M.D. Investigation of the iodine-poly(vinylpyrrolidone) interaction employed in the determination of biocidal iodine by colorimetric solid-phase extraction. *Analytica Chimica Acta*, 510:241–247, 2004.
- [13] Mallinckrodt Baker MSDS: Material Safety Data Sheet. Iodine. <http://www.jtbaker.com/msds/englishhtml/i2680.htm>, 2009.
- [14] Ignatova M. et al. Electrospun microfibrinous poly(styrene-*alt*-maleic anhydride)/poly(styrene-*co*-maleic anhydride) mats tailored for enzymatic remediation of water polluted by endocrine disruptors. *European Polymer Journal*, 45: 2494–2504, 2009.
- [15] Dalton P.D., Klee D., and Mööller M. Electrospinning with dual collection rings. *Polymer*, 46:611–614, 2005.
- [16] Beachley V. and Wen X. Effect of electrospinning parameters on the nanofiber diameter and length. *Materials Science and Engineering C*, 29:663–668, 2009.
- [17] Wang B., Wang Y., Yin T., and Yu Q. Applications of electrospinning technique in drug delivery. *Chemical Engineering Communications*, 197(10):1315–1338, 2010.
- [18] Tripatanasuwan S., Zhong Z., and Reneker D.H. Effect of evaporation and solidification of the charged jet in electrospinning of poly(ethylene oxide) aqueous solution. *Polymer*, 48:5742–5746, 2007.
- [19] Heikkilä P. and Harlin A. Parameter study of electrospinning of polyamide-6. *European Polymer Journal*, 44:3067–3079, 2008.
- [20] Rutledge G.C. and Fridrikh S.V. Formation of fibers by electrospinning. *Advanced Drug Delivery*, 59:1384–1391, 2007.
- [21] Baji A. et al. Electrospinning of polymer nanofibers: Effects on oriented morphology, structures and tensile properties. *Composites Science and Technology*, 70:703–718, 2010.
- [22] Henriques C., Vidinha R., Botequim D., Borges J.P., and Silva J.A.M.C. A systematic study of solution and processing parameters on nanofiber morphology using a new electrospinning apparatus. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 8:1–11, 2008.
- [23] Ma G. et al. Preparation and characterization of composite fibers from organic-soluble chitosan and poly-vinylpyrrolidone by electrospinning. *Front. Mater. Sci. China*, 4(1): 64–69, 2010.

- [24] Fong H., Chun I., and Reneker D.H. Beaded nanofibers formed during electrospinning. *Polymer*, 40:4585–4592, 1999.
- [25] Demir M.M., Yilgor I., Yilgor E., and Erman B. Electrospinning of polyurethane fibers. *Polymer*, 43:3303–3309, 2002.
- [26] Lannutti J. et al. Electrospinning for tissue engineering scaffolds. *Material Science and Engineering C*, 27:504–509, 2007.
- [27] Saltzman W. Mark. *Tissue Engeneering - Principles for the design of replacement organs and tissues*. Oxford University Press, Inc., 2004.
- [28] Faria D.L.A. de, Gil H.A.C., and Queiróz A.A.A. de. The interaction between polyvynilpyrrolidone and i_2 as probed by raman spectroscopy. *Journal of Molecular Structure*, 479:93–98, 1999.
- [29] Clemens Van Blitterswijk. *Tissue engineering*. Academica press series in biomedical engineering, 2008.
- [30] Mishra A. and Chaudhary N. Study of povidone iodine loaded hydrogels as wound dressing material. *Trends Biomater. Artif. Organs*, 23(3):122–128, 2010.
- [31] Sionkowska A., Kozłowska J., Planecka A., and Skopinska-Wisniewska J. Photochemical stability of poly(vinyl pyrrolidone) in the presence of collagen. *Polymer Degradation and Stability*, 93:2127–2132, 2008.
- [32] Bhagat P.R. et al. Molecular iodine preconcentration and determination in aqueous samples using poly(vinylpyrrolidone) containing membrantes. *Talanta*, 74(5):1313–1320, 2008.
- [33] BODE Chemie GmbH. Povidon-iod (pvp-iod). http://bode-chemie.de/science/hintergrundwissen/desinfektionswirkstoffe_povidon.php, 2008.
- [34] Padovani C.M., Graziano K.U., and Goveia V.R. Avaliao microbiológica das diferentes formulações anti-sépticas, polivinilpirrolidona-iodo e clorexidina, após contaminação intencional das almotolias. *Rev Latino-am Enfermagem*, 16(6), 2008.
- [35] Black J. G. *Microbiology: Principles and Exploration*, 7ed. John Wiley & Sons, Inc., 2008.
- [36] Pelczar M., Reid R., and Chang E.C.S. *Microbiologia, volume II - tradução por Pereira, M.A.M. e Borges, M.R.S.* Editora McGraw-Hill do Brasil, 1981.
- [37] Murray Patrick R. *Manual of Clinical Microbiology*, 8td ed. ASM Press Washington D.C., 2003.

- [38] Heymsfield S.B. et al. *Human Body Composition, 2nd ed.* editors, 2005.

Apêndice A

A seguinte comunicação para a conferência TERMIS-EU 2011, relativa a este trabalho, foi submetida e aceite sob a forma de POSTER.

Title of the work

BIOCIDAL ACTIVIVITY OF IODINE RELEASED FROM DIRECTLY UV
PHOTOCROSSLINKED POLYVINILPIRROLIDONE ELECTROSPUN MATS

Authors

Fernandes AS

Cefitec, Departamento de Física, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Portugal
andreaia.sfernandes@gmail.com

Santos-Sanches I

CREM, Departamento de Ciências da Vida, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Portugal
isanches@fct.unl.pt

Sotomayor J

Requimte, Departamento de Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Portugal
jcs@dq.fct.unl.pt

Silva JC

Cefitec, Departamento de Física, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Portugal
jcs@fct.unl.pt

Henriques CR

Cefitec, Departamento de Física, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Portugal crh@fct.unl.pt

Preferred type of presentation

Poster

Symposium or session where you prefer your abstract to be presented

TISSUE ENGINEERING OF SKIN: FROM BASIC RESEARCH TO NOVEL THERAPIES

Keywords

Nanofibers, iodine-release, UV-crosslinking, microbiologic cultures, wound-dressing, skin substitute

Abstract text

INTRODUCTION

Electrospun nanofibrous mats are particularly adequate for skin wound dressings. Their high porosity and surface to volume ratio ensure gas permeability, contribute to a correct fluid management and enable a sustainable release of biocidal agents. The typically small pore dimension is, by itself, a first barrier to infectious agents. In this work, we studied the release of iodine (a wide spectrum biocidal) from directly ultraviolet-crosslinked nanofibers of polyvinylpyrrolidone (PVP, a water soluble hydrophilic polymer). Their antimicrobial activity was evaluated.

EXPERIMENTAL METHODS

Solutions containing 18% PVP and 5% of a PVP complex with elemental iodine (PVP-I), in water-ethanol (1:1) were electrospun using an applied field of 1.3kV/cm. The resulting non-woven mats were irradiated under UV for different periods of time in order to photocrosslink the polymer. The release of iodine, from the mats into water, was analysed by UV-visible spectrophotometry. The biocidal activity was evaluated by the Bauer-Kirby disk diffusion test in confluent *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans* cultures.

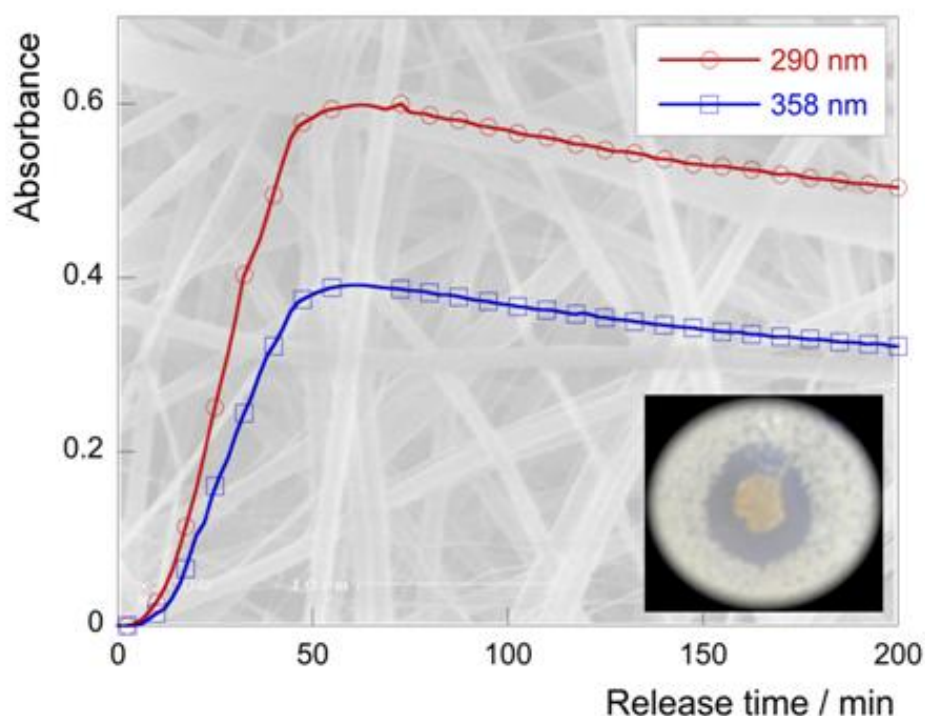
RESULTS AND DISCUSSION

Under UV irradiation, the light yellow fibre mats turn lighter with exposure time. The mats become insoluble in water after a minimum irradiation time of 60min. The absorbance peaks in the UV spectrum at 291 and 358nm (due to the I_3^- species) increase with release time,

reach a maximum and then slowly decrease. The mat crosslinked during 4h yields the lowest release rate with the maximum being reached after 50min. This sample produced inhibition zones visible in all confluent cultures after 48h of incubation on agar. No inhibition zone was visible around a PVP nanofibrous control, without PVP-I.

CONCLUSION

PVP nanofibers incorporating iodine were photocrosslinked without any photoinitiator. Their biocidal activity makes them good candidates for wound dressings and as an epidermal equivalent in skin substitutes.



Apêndice B

Na seguinte imagem, pode ser observado o esquema utilizado para fazer os testes de CMI.



É necessário ter em conta que cada célula das tabelas apresentadas representa um poço da placa de poços e, além disso, que:

- LB e YM são meios líquidos de crescimento (respectivos aos já enunciados com as mesmas siglas);
- D0 a D10 são as diluições utilizadas (de PVP-I em água destilada), que se podem consultar na tabela 3.10;
- S.a., S.e., P.a. e C.a. representam, respectivamente, as estirpes *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*.

As concentrações de microorganismos utilizadas foram 10^7 UFC/ml nas estirpes bacterianas e 10^6 UFC/ml para o fungo.

Na coluna 1 foram colocados 200 μ l de meios líquidos que serviram como controlo de esterilidade dos mesmos e, da coluna 2 à coluna 12 de cada tabela, foram colocados 100 μ l da diluição D0 a D10 e 100 μ l de estirpe, como indicado nas células sob o modo de $Dx + \text{estirpe}$, em que x é o número da diluição utilizada. Ou seja, ao longo de todas as colunas (de 2 a 12), além dos 100 μ l de diluição indicada, foram colocados: na placa 1, nas linhas A a C, 100 μ l de estirpe *S. epidermidis* e nas linhas D a F, 100 μ l de estirpe *S. aureus*; na placa 2, nas linhas A a C, 100 μ l de estirpe *P. aeruginosa* e nas linhas D a F, 100 μ l de estirpe *C. albicans*.

PLACA 1												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	LB	D0 + S.e.	D1 + S.e.	D2 + S.e.	D3 + S.e.	D4 + S.e.	D5 + S.e.	D6 + S.e.	D7 + S.e.	D8 + S.e.	D9 + S.e.	D10 + S.e.
B	LB	D0 + S.e.	D1 + S.e.	D2 + S.e.	D3 + S.e.	D4 + S.e.	D5 + S.e.	D6 + S.e.	D7 + S.e.	D8 + S.e.	D9 + S.e.	D10 + S.e.
C	LB	D0 + S.e.	D1 + S.e.	D2 + S.e.	D3 + S.e.	D4 + S.e.	D5 + S.e.	D6 + S.e.	D7 + S.e.	D8 + S.e.	D9 + S.e.	D10 + S.e.
D	LB	D0 + S.a.	D1 + S.a.	D2 + S.a.	D3 + S.a.	D4 + S.a.	D5 + S.a.	D6 + S.a.	D7 + S.a.	D8 + S.a.	D9 + S.a.	D10 + S.a.
E	LB	D0 + S.a.	D1 + S.a.	D2 + S.a.	D3 + S.a.	D4 + S.a.	D5 + S.a.	D6 + S.a.	D7 + S.a.	D8 + S.a.	D9 + S.a.	D10 + S.a.
F	LB	D0 + S.a.	D1 + S.a.	D2 + S.a.	D3 + S.a.	D4 + S.a.	D5 + S.a.	D6 + S.a.	D7 + S.a.	D8 + S.a.	D9 + S.a.	D10 + S.a.
G												
H												
	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	






S. epidermidis
10⁷ UFC/mL

S. aureus
10⁷ UFC/mL

(a)

PLACA 2												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	LB	D0 + P.a.	D1 + P.a.	D2 + P.a.	D3 + P.a.	D4 + P.a.	D5 + P.a.	D6 + P.a.	D7 + P.a.	D8 + P.a.	D9 + P.a.	D10 + P.a.
B	LB	D0 + P.a.	D1 + P.a.	D2 + P.a.	D3 + P.a.	D4 + P.a.	D5 + P.a.	D6 + P.a.	D7 + P.a.	D8 + P.a.	D9 + P.a.	D10 + P.a.
C	LB	D0 + P.a.	D1 + P.a.	D2 + P.a.	D3 + P.a.	D4 + P.a.	D5 + P.a.	D6 + P.a.	D7 + P.a.	D8 + P.a.	D9 + P.a.	D10 + P.a.
D	YM	D0 + C.a.	D1 + C.a.	D2 + C.a.	D3 + C.a.	D4 + C.a.	D5 + C.a.	D6 + C.a.	D7 + C.a.	D8 + C.a.	D9 + C.a.	D10 + C.a.
E	YM	D0 + C.a.	D1 + C.a.	D2 + C.a.	D3 + C.a.	D4 + C.a.	D5 + C.a.	D6 + C.a.	D7 + C.a.	D8 + C.a.	D9 + C.a.	D10 + C.a.
F	YM	D0 + C.a.	D1 + C.a.	D2 + C.a.	D3 + C.a.	D4 + C.a.	D5 + C.a.	D6 + C.a.	D7 + C.a.	D8 + C.a.	D9 + C.a.	D10 + C.a.
G												
H												
	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	

P. areuginosa

10⁷ UFC/mL

C. albicans

10⁶ UFC/mL

(b)

Figura B.1: Representação esquemática da placa 1 (a) e da placa 2 (b) para determinação da CMI com PVP-I